

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades an der  
Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

Thema:

**Eine zelluläre und molekulare Charakterisierung der  
Gliazellen des Zentralkomplexes im embryonalen Gehirn  
von *Schistocerca gregaria***

Vorgelegt von:

**Michael Loser**

München, 17. Juni 2015

Diese Dissertation wurde angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. George Boyan in  
der Abteilung Neurobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität in München

1. Gutachter: Prof. Dr. George Boyan

2. Gutachter: PD Dr. Mario Wullimann

Datum der mündlichen Prüfung: 30.10.2015

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	i
Abbildungsverzeichnis .....	iv
Tabellenverzeichnis .....	vi
Zusammenfassung .....	1
Abstract .....	3
1 Einleitung.....	5
1.1 Modellorganismus Heuschrecke .....	5
1.2 Einführung in das Gehirn von <i>Schistocerca gregaria</i> .....	8
1.3 Der Zentralkomplex .....	11
1.4 Entwicklung des Zentralkörpers .....	14
1.5 Gliazellen .....	21
1.5.1 Gliazellen des Gehirns .....	26
1.6 Glutaminsynthetase .....	27
1.7 Ontogenese und Entwicklung der Gliazellen im Heuschreckengehirn.....	29
2 Ziele und Fragestellung der Arbeit .....	34
3 Material und Methoden.....	36
3.1 Haltung und Aufzucht.....	36
3.2 Altersbestimmung der Versuchstiere .....	37
3.3 Präparationen.....	38
3.4 Fixierung .....	39
3.4.1 Bouin (wässrig) .....	39
3.4.2 Paraformaldehyd (PFA) .....	39
3.5 Einbetten der Präparate .....	40
3.6 Immunhistochemie .....	41
3.6.1 anti-Glutaminsynthetase .....	42
3.6.2 anti-HRP .....	43
3.6.3 anti-Repo .....	44
3.6.4 DAPI-Färbung .....	44
3.7 Tracerexperimente .....	45
3.8 Gap-junctional blocker .....	47
3.9 Eindeckeln der Präparate.....	47

3.10	Mikroskopie .....	48
3.11	Bildbearbeitung .....	48
3.12	Achsen und Begriffe .....	48
3.13	Pufferlösungen .....	49
4	Ergebnisse .....	51
4.1	Module des Zentralkomplexes des Mittelgehirns .....	51
4.1.1	Die Entwicklung der Neuropile des Mittelgehirns und deren Abgrenzung durch Gliazellen .....	52
4.1.2	Die Umverteilung der Gliazellen des Mittelhirns im Verlauf der Embryogenese .....	56
4.1.3	Astrozytenähnliche Gliazellen, jedoch keine Neurone umrunden das Neuropil des Zentralkörpers .....	57
4.1.4	Verbreitung und Entwicklung der Gliazellen des Mittelhirnneuropils .....	59
4.2	Identifizierung und Zuordnung der Gliazellen zu astrozytenähnlichen Gliazellen .....	61
4.2.1	Das Enzym Glutaminsynthetase markiert Gliazellen und deren Projektionen im Mittelhirn .....	62
4.2.2	Gliaprojektionen, die mit den Modulen des Zentralkomplexes in Zusammenhang stehen .....	65
4.2.3	Das Auftreten der Gliaprozesse im Zentralkörper .....	67
4.3	Astrozytenähnliche Gliazellen sind über gap junctions miteinander gekoppelt und bilden ein zelluläres Netzwerk .....	69
4.3.1	Muster der Zellkopplung bei 100% (nach Schlüpfen) .....	69
4.3.2	Muster der Zellkopplung bei 70% (verlaufender Embryogenese) .....	77
4.3.3	Die gekoppelten Zellen sind Gliazellen .....	79
4.3.4	Gap-junctional Blocker .....	81
4.3.5	Die Entwicklung der Gliaprojektionen (Gliapodia) .....	82
5	Diskussion .....	85
5.1	Der Gliamarker Glutaminsynthetase .....	85
5.2	Interaktion zwischen Gliazellen und Neurone während der Entwicklung des ZNS .....	87
5.3	Zellkopplung und gap junctions .....	93
5.4	Gliapodien und Zellkopplung während der Entwicklung .....	96
5.5	Postembryonale Reifung des Zentralkomplexes .....	97
6	Ausblick .....	103
7	Abkürzungsverzeichnis .....	105



8 Literaturverzeichnis .....	109
Danksagung .....	131
Lebenslauf .....	132
Publikationen .....	133
Eidesstattliche Erklärung .....	134

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Taxonomie der Wüstenheuschrecke <i>Schistocerca gregaria</i> .....	5
Abbildung 1.2: <i>Schistocerca gregaria</i> in gregärer Phase und solitärer Phase. ....	6
Abbildung 1.3: Vergleich der Entwicklung der hemimetabolen <i>Schistocerca gregaria</i> und der holometabolen <i>Drosophila melanogaster</i> . ....	7
Abbildung 1.4: Dreidimensionale Darstellung des adulten Gehirns von <i>Schistocerca gregaria</i> in dorsaler Ansicht. ....	9
Abbildung 1.5: Neuroblasten und ihre Lineages.....	10
Abbildung 1.6: Vergleich des single precursor modes und des cell cluster modes. ....	12
Abbildung 1.7: Topographische Kreuzung der Axone ist eine konservierte Neuroarchitektur der adulten cerebralen Mittellinie der Panarthropoda, ungeachtet ob die Neurone durch den single precursor mode (A-C) oder den cell cluster mode (D-F) generiert werden. ....	13
Abbildung 1.8: Muster der Zellcluster und Axonprojektionen von Zelllinien des Zentralkomplexes zur Entwicklung der Mittelhirnneuropile in der Heuschrecke und <i>Drosophila</i> . ....	15
Abbildung 1.9: Die Umwandlung des primären Axongerüsts des Insektengehirns in eine chiasmale Neuroarchitektur. ....	17
Abbildung 1.10: Schematische Darstellung des konservierten Musters der Axonkreuzung im sich entwickelnden Gehirn der Heuschrecke <i>Schistocerca gregaria</i> und <i>Drosophila</i> . ....	19
Abbildung 1.11: Unterschiedliche Gliazelltypen im Bauchmark von Insekten .....	21
Abbildung 1.12: Verteilungsmuster extrinsischer und intrinsischer Gliazellen einer repräsentativen Zelllinie (y) in apikaler Ansicht. ....	24
Abbildung 1.13: Gliazellen grenzen das Neuropil des Zentralkörpers im Mittelhirn bei <i>Schistocerca gregaria</i> ein. ....	28
Abbildung 1.14: Schematische Darstellung des Musters der Gliazellen im embryonalen Gehirn von <i>Schistocerca gregaria</i> zu unterschiedlich Entwicklungsstufen. ....	30
Abbildung 1.15: Schematische Darstellung der Entwicklung der Faserkommissuren durch einen "glia sling" in einem frühen Entwicklungsstadium in <i>Drosophila</i> und Heuschrecke. ....	31
Abbildung 3.1: Altersbestimmung anhand der Beinanlagen von <i>Schistocerca nitens</i> in 5%igen Entwicklungsschritten beginnend bei 25%. ....	38
Abbildung 4.1: Module des Zentralkomplexes im Protocerebrum einer ausgewachsenen Heuschrecke. ....	52

Abbildung 4.2: Entwicklung des Neuropils des Zentralkörpers und dessen Kompartimentalisierung durch Gliazellen des Mittelhirns. ....	54
Abbildung 4.3: Umverteilung der Gliazellen im Mittelhirn im Verlauf der Embryogenese.....	56
Abbildung 4.4: Gliazellen, die am Ende der Embryogenese (100%) das Neuropil des Zentralkomplexes umrunden sind vorherrschend astrozytenähnlich.....	58
Abbildung 4.5: Verteilung Repo-positiver Gliazellen in Bezug auf sich entwickelnde neuronale Pfade im embryonalen Mittelhirn. ....	60
Abbildung 4.6: Die Glutaminsynthetase (GS)-positiven Zellen im Mittelhirn sind keine Neurone. ....	62
Abbildung 4.7: Glutaminsynthetase-positive Zellen im protocerebralen Mittelhirn. ....	64
Abbildung 4.8: Morphologische Muster und Muster der Projektionen GS-positiver astrozytenähnlicher Gliazellen bei 80%iger Embryogenese, die mit dem Zentralkörper assoziiert sind.....	66
Abbildung 4.9: Das Auftreten der Projektionen von Gliazellen innerhalb des Zentralkörpers.....	68
Abbildung 4.10: Zellkopplung zwischen vermeintlichen Gliazellen. ....	71
Abbildung 4.11: Schematische Darstellung des Musters der Zellkopplung bei 100%iger Embryogenese. ....	73
Abbildung 4.12: Die Zellkopplung zeigt, dass die meisten Zellen bei 100%iger Embryogenese um den Zentralkörper herum gefunden wurden. ....	76
Abbildung 4.13: Zellkopplung zwischen vermeintlichen Gliazellen. ....	77
Abbildung 4.14: Die gekoppelte Zellen sind astrozytenähnliche Gliazellen. ....	80
Abbildung 4.15: <i>n</i> -Heptanol blockiert Zellkopplung zwischen Gliazellen die mit dem Zentralkomplex assoziiert sind. ....	82
Abbildung 4.16: Dendritische Projektionen astrozytenähnlicher Gliazellen im Verlauf von vier Entwicklungsstadien die mit dem Zentralkörper assoziiert sind. ....	83
Abbildung 5.1: Der <i>karussell</i> Phänotyp. ....	88
Abbildung 5.2: Schematische Darstellung der Organisation der Gliazellen anhand drei unterschiedlicher embryonaler Entwicklungsstadien. ....	90
Abbildung 5.3: Gliapodien dringen in die säulenartigen Faserbündeln innerhalb des Zentralkörpers des w, x, y, z, Traktsystems ein.....	98
Abbildung 5.4: Glutaminimmunreaktivität im adulten Mittelhirn von <i>Schistocerca gregaria</i> .....	101

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 4.1: Vergleich des Mittelwertes gefärbter Zellen resultierend aus Zellkopplung. ....	74
--	----

## Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Expression des astrozytenspezifischen Enzyms Glutaminsynthetase in Ergänzung zum gliaspezifischen Marker Repo, um Gliazellen, die mit der embryonalen Entwicklung des Zentralkomplexes in *Schistocerca gregaria* assoziiert sind, zellulär und molekular zu charakterisieren. Der Zentralkomplex ist ein modulares System neuropiler Strukturen im Mittelhirn aller Insekten, und ist in vielen Verhaltensvorgängen wie Laufen, Fliegen, Stridulation und Ernährung involviert. In der Heuschrecke entwickeln sich die Neuropile des Zentralkomplexes im Laufe der Embryogenese und sind zum Zeitpunkt des Schlüpfens funktionsfähig. Trotz großer Kenntnisse neuronaler Aspekte über die Entwicklung des Zentralkomplexes verbleibt die Funktion der Gliazellen unklar.

In dieser Arbeit wurde das Expressionsmuster des astrozytenspezifischen Enzyms Glutaminsynthetase (GS) und des gliaspezifischen Homöobox Gens *reversed polarity (repo)* in Kombination mit der negativen Expression des neuron-spezifischen Markers Meerrettich Peroxidase (HRP) zur Identifizierung glialer Zellen benutzt.

Doppelfärbungen zeigen, dass alle GS-positiven Zellen, die mit dem Zentralkomplex assoziiert sind, gleichzeitig Repo-positiv sind. Zum ersten Mal konnte ich durch diese Kombination nicht nur Zellkörper, sondern auch Projektionen (Gliapodien) der Gliazellen sichtbar machen. Während der Embryogenese, also noch vor der Entwicklung des Zentralkomplexes, formen Gliazellen eine zusammenhängende Population, die aus der Pars intercerebralis in die Region der Faserbündel einwandert. Anschließend verteilen sich die Gliazellen neu und umhüllen jedes der einzelnen Module des Zentralkomplexes. Innerhalb der einzelnen Neuropile des Zentralkomplexes sind keine glialen Zellkörper zu finden. Rekonstruktionen einzelner Zellen zeigen Populationen von Gliazellen, die ausgedehnte umhüllende Projektionen um die Neuropile des Zentralkomplexes, wie den Zentralkörper, senden, während eine andere Population von Gliazellen säulenartige Verzweigungen in den Zentralkörper hinein projiziert. Solche Verzweigungen in den Modulen des Zentralkomplexes sind erst nach Fertigstellung der Neuroarchitektur zu erkennen. Daher kann man annehmen, dass diese Verzweigungen auf ein zuvor entstandenes Gerüst von Neuronen oder Tracheen projizieren. Höchstwahrscheinlich sind diese Gliaprojektionen in die Transmitterregulation innerhalb des Neuropils involviert.

Da Gliazellen weitreichende Projektionen (Gliapodien) in und um die Mittelhirnneuropile senden, wurden in gefrorenen Hirnschnitten intrazelluläre Injektionen durchgeführt um zu erforschen, ob diese Gliazellen ein zelluläres Netzwerk via Zellkopplung im Verlauf der Embryogenese bilden. Färbungen individueller Zellen, die an vier unterschiedlichen Injektionsstellen um den Zentralkörper lokalisiert sind, zeigen eine Population gekoppelter Zellen, deren Anzahl und räumliche Verteilung stereotypisch für jeden der Injektionspunkte ist. Darüber hinaus sind sie sowohl bei 70%igem wie auch bei einem embryonalen Entwicklungsstand von 100% miteinander vergleichbar. Anschließende immunhistochemische Experimente bestätigen, dass es sich bei den gekoppelten Zellen um astrozytenähnliche Gliazellen handelt. Durch Hinzufügen von *n*-Heptanol in das Puffermedium wurde die Zellkopplung verhindert. Da die Zellkopplung auch ohne direkten intersomalen Kontakt auftritt, könnten die erheblichen Verzweigungen der Gliapodien, die sich im Laufe der Embryogenese ausbreiten, involviert sein. Durch die Datenerhebung aller Injektionspunkte kann darauf geschlossen werden, dass die Gliazellen, welche den Zentralkörper umrunden, ein Netzwerk gekoppelter Gliazellen bilden, das als Positionierungssystem der sich entwickelnden Neuropile des Zentralkomplexes dient.

## Abstract

This thesis employs cellular and molecular methods to characterize glia associated with the central complex of the brain during embryonic development of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. The central complex is a modular system of neuropils in the midbrain of all insects, and is involved in regulating a range of behaviors such as walking, flight, stridulation and feeding. In the grasshopper, these neuropils develop during embryogenesis and are functional at the time of hatching. Despite considerable knowledge about neuronal aspects of central complex development, the role of glia remains obscure.

I have used the expression patterns of the astrocyte-specific enzyme glutamine synthetase (GS) and the glia-specific homeobox gene *reversed polarity* (*repo*), in combination with the negative expression of the neuron-specific cell surface marker horseradish peroxidase (HRP), to identify glia in the embryonic brain of the grasshopper. Together, the cytoplasmic GS-expression, and the nuclear *repo*-expression allow not only the cell somata, but also their projections (gliopodia) to be visualized during development for the first time. Early in development, prior to formation of the central complex, glia are distributed in a non-specific way in the pars intercerebralis of the midbrain. Subsequently, glia are seen to migrate into the developing commissural system of the midbrain and then redistribute again to surround the central complex neuropils as they form. Reconstructions of individual glia cells associated with the central complex show that some glia generate extensive projections which envelop the neuropil. Others direct projections into the neuropil where they arborize extensively among the fiber columns formed by the axons of neurons from the pars intercerebralis. Since the glial projections only develop after those of the neurons, I speculate that glia utilize a pre-formed scaffold of axons or tracheae to innervate the central complex. It is likely that the glial projections are involved in transmitter regulation at synaptic sites within the neuropil.

In order to establish whether the glia associated with the central complex form a network of communicating cells, I performed intracellular stainings of glia in frozen slices of the midbrain at different stages of embryonic development. Cells were identified as glia by immunolabeling against GS. Once injected into an individual glia cell, the fluorochrome Alexa568 consistently and rapidly spread to a restricted set of

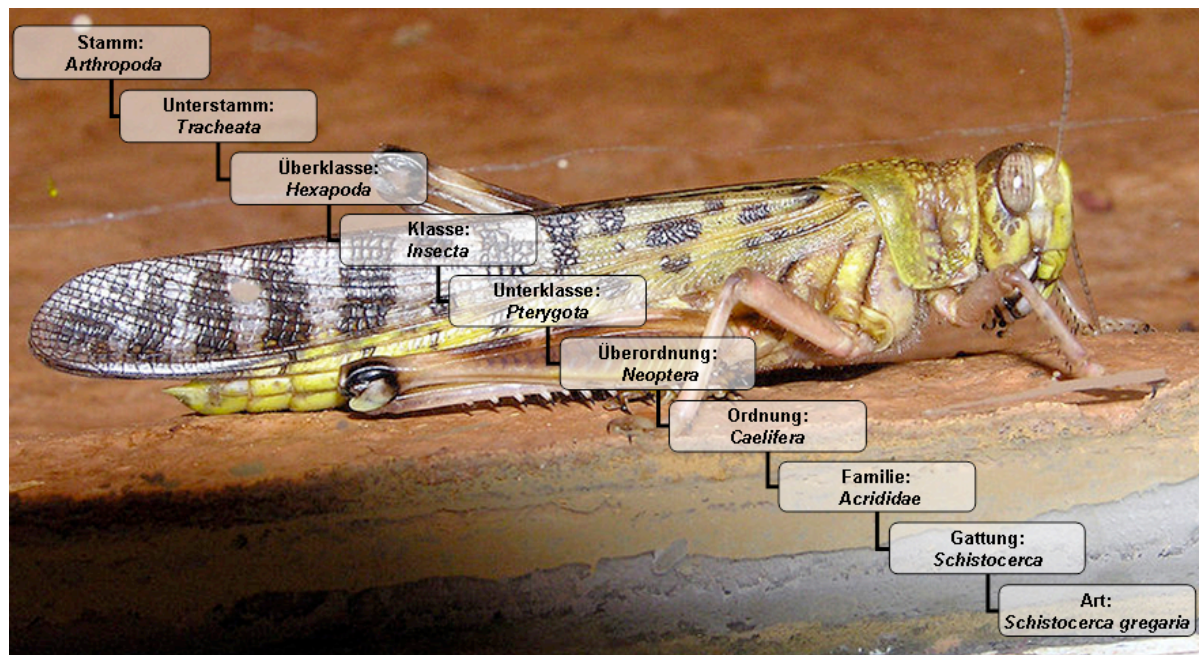
neighboring cells. The population of dye-coupled cells was stereotypic and depended on its location (anterior, posterior, lateral) with respect to the central body module, suggesting that subsets of linked cells are present. Addition of the established gap-junctional blocker *n*-heptanol to the bathing saline prevented dye-coupling, consistent with the presence of gap junctions between glia. Dye-coupling was present without direct intersomal contact suggesting that the gliapodia are involved in establishing the network. The data lead me to speculate that the network of dye-coupled cells surrounding the central complex may function as a positioning system for the developing neuropils of the central complex.



# 1 Einleitung

## 1.1 Modellorganismus Heuschrecke

Die Systematik der Wüstenheuschrecke *Schistocerca gregaria*, die in dieser Doktorarbeit als Modellorganismus dient, lässt sich gemäß der auf Abbildung 1.1 dargestellten taxonomischen Einteilung klassifizieren:



**Abbildung 1.1: Taxonomie der Wüstenheuschrecke *Schistocerca gregaria***

Quelle: <http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/1531351> (modifiziert)

*Schistocerca gregaria*, auch als Wanderheuschrecke bekannt, hat ein weites Verbreitungsgebiet. Aufgrund der Lebensweise der *Schistocerca gregaria* findet man diese überwiegend in ariden nordafrikanischen Klimagebieten, aber auch in Teilen Asiens und im mittleren Osten. Dabei wirkt sich das Klima auf die Lebensweise der Wüstenheuschrecke *Schistocerca gregaria* aus. Ist die Witterung trocken, leben die Tiere in einer solitären stationären Phase. Sobald sich das Klima ändert, Regen fällt und dadurch der Boden aufgelockert wird, kommt es zur vermehrten Eiproduktion der Weibchen, und damit zum Übergang von der solitären, ortsgebundenen Phase hin zur gregären Phase (Schwarmphase). Durch die vermehrte Eiproduktion und der damit einhergehenden Steigerung der Populationsdichte, sind die Tiere gezwungen

ihre Ortsgebundenheit aufzugeben, und es kommt zu den verheerenden erntefressenden Schwärmen. Die Wechsel zwischen der solitären und der gregären Phase werden durch neuroaktive Substanzen gesteuert (Rogers et al., 2004). So ist z.B. Serotonin, das vermehrt durch Berührungsreize an den Hinterbeinen der Heuschrecken ausgeschüttet wird, für die Einleitung der schwarmbildende Phase verantwortlich (Antsey et al., 2009). Da die Tiere auf diesen Schwarmwanderungen lange Strecken zurücklegen, muss eine fehlerfreie Koordination der Bewegungsabläufe gewährleistet sein. Durch Mutationsanalysen in *Drosophila melanogaster* wurde gezeigt, dass der Zentralkomplex eine Schlüsselrolle in der Bewegungskoordination einnimmt. Entstandene, durch Mutationen hervorgerufene Defekte im Zentralkomplex bei *Drosophila melanogaster* wirkten sich z.B. auf die Fußkoordination und auf eine verringerte lokomotorische Antwort aus (Strauss et al., 1992; Strauss und Heisenberg 1993; Strauss 1996, 2002).

Nicht nur das Verhalten von *Schistocerca gregaria* wird durch das Klima bestimmt. So sind die Tiere in der solitären Phase grünlich bis bräunlich gefärbt. Sobald sie in die gregäre Phase übertreten sind die Tiere zunächst rosa gefärbt, das später in eine gelbliche Färbung übergeht (Abbildung 1.2).

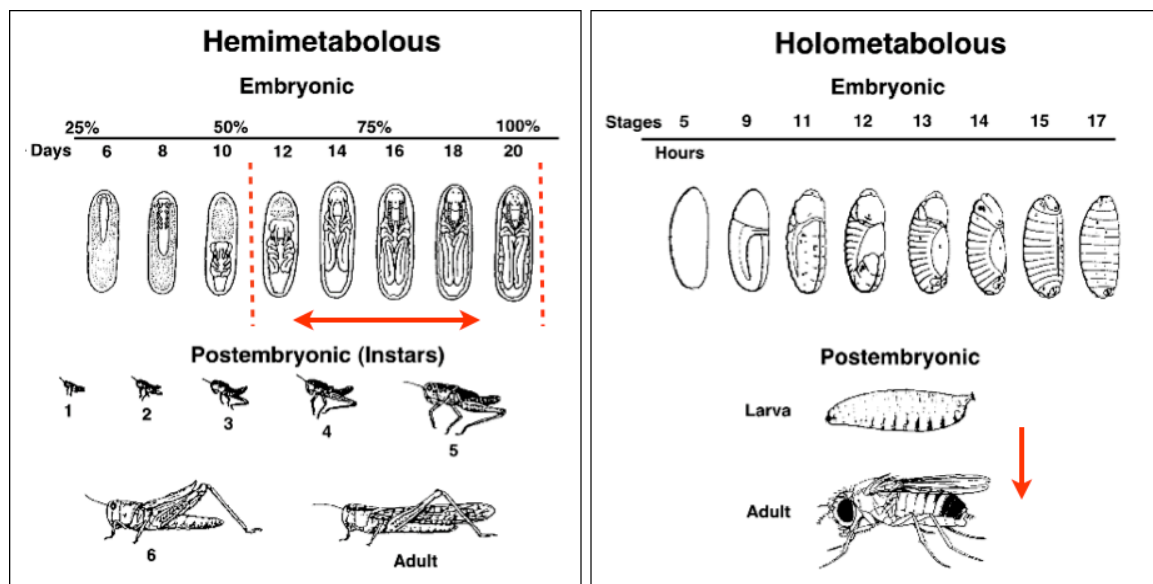


**Abbildung 1.2:** *Schistocerca gregaria* in gregärer Phase und solitärer Phase.

Quelle: <http://www.spektrum.de/news/glueckshormon-laesst-heuschrecken-schwaermen/980322>

Neben der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ist die Heuschrecke *Schistocerca gregaria* eine der wichtigsten Modellorganismen der Neurobiologie auf dem Gebiet der Insektenforschung. Dies beginnt schon Ende des 19. Jahrhunderts mit der Entdeckung der ersten Stammzellen im Zentralnervensystem der Heuschrecke (Wheeler, 1891). Auch die ersten so genannten Pionierneurone wurden im Modellsystem *Schistocerca gregaria* entdeckt (Bate, 1976). Ein Faktor ist sicherlich

auch die Größe des Insekts und die damit einhergehenden, leicht zu erreichenden neuropilen Strukturen. *Schistocerca gregaria* zählt zu den hemimetabolen Insekten und durchläuft somit, im Vergleich zu *Drosophila melanogaster*, kein metamorphoses Puppenstadium (Abbildung 1.3). Dies ist ein weiterer Vorteil bei der Untersuchung neurobiologischer Entwicklungsvorgänge, da die Larven der Tiere als „vereinfachte“ Imagos aus dem Ei schlüpfen (Boyan und Ball, 1993; Seidel und Bicker, 2002; Williams et al., 2005). Aufgrund der Lebensweise der Heuschrecke, die zu den hemimetabolen Insekten zählt, sind die Bewegungskontrollzentren, also der Zentralkomplex, zum Zeitpunkt des Schlüpfens schon angelegt, da das Tier zu diesem Zeitpunkt schon fundamentale Verhaltensvorgänge wie Bewegung und Nahrungsaufnahme bewerkstelligen muss (Stevenson und Kutsch 1986).



**Abbildung 1.3:** Vergleich der Entwicklung der hemimetabolen *Schistocerca gregaria* und der holometabolen *Drosophila melanogaster*.

**Erklärung zu Abbildung 1.3:** Die roten Pfeile stellen die zeitliche Entwicklung des Zentralkomplexes dar.

Quelle: George Boyan, Vorlesung: Fundamentals in Neurobiology. 2013

Andere Verhaltens- und Bewegungsvorgänge, wie z.B. das Fliegen und das Fortpflanzen finden erst während der Postembryogenese, bzw. im adulten Tier durch Neurogenese, Axogenese und Synaptogenese, statt (siehe Chapman 1982). Diese Tatsache ermöglicht somit eine vollständige Untersuchung der neurobiologischen Entwicklung vom Embryonalstadium über das Postembryonalstadium bis hin zum

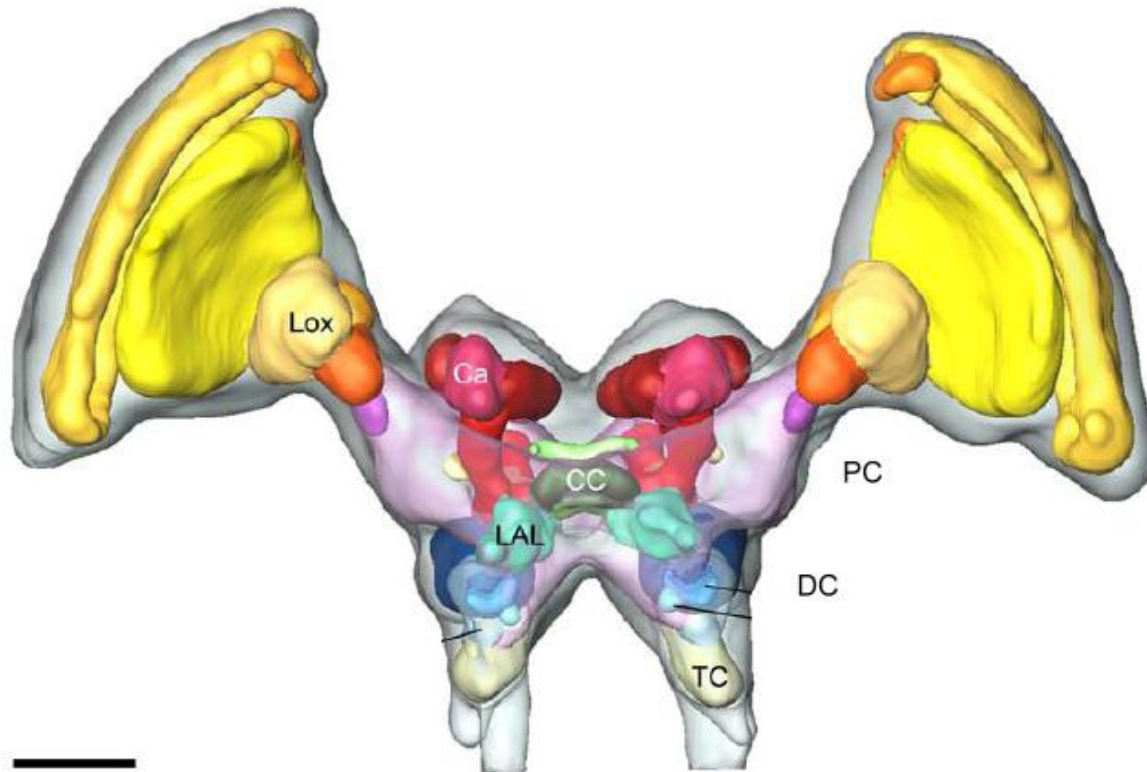
adulten Tier (Prokop und Technau, 1994; Boyan und Williams, 1997; Urbach und Technau, 2003; Williams et al., 2005; Boyan et al., 2008).

Ein weiterer Vorteil des Modellsystems *Schistocerca gregaria* ist auch die Anzahl der Neurone im Invertebratengehirn, da diese Neurone im Gegensatz zu denen im Vertebratengehirn in einer relativ überschaubaren Anzahl vorliegen. Diese Tatsachen machen Untersuchungen zellulärer und molekularer Prozesse wie Morphogenese und Axogenese (Boyan und Ball, 1993; Reichert, 1993; Goodman und Doe, 1994) am Modellsystem *Schistocerca gregaria* so attraktiv. Des Weiteren wurden bereits Daten über die Anzahl und die Verteilung der Neuroblasten im Heuschreckengehirn erhoben (Zacharias et al., 1993), speziell auch über die Neuroblasten, die den Zentralkomplex hervorrufen (Boyan und Williams, 1997; Williams et al., 2005). Bekannt ist auch, wie sich das axonale Netzwerk der Kommissuren im Laufe der Embryogenese entwickelt (Boyan et al., 1995 a, b, c). Zentrales Thema dieser Arbeit ist die embryonale Entwicklung einer im Protocerebrum liegenden neuropilen Struktur, dem Zentralkomplex. Das Hauptaugenmerk liegt hierbei auf der Untersuchung der embryonalen Entwicklung des Zentralkörpers, der Teil des Zentralkomplexes ist, und auf den mit dessen Entwicklung zusammenhängenden Gliazellen.

### 1.2 Einführung in das Gehirn von *Schistocerca gregaria*

Die Expression des Segmentpolaritätgens *engrailed* beweist, dass sich das Gehirn der Heuschrecke aus drei Teilen zusammensetzt. Während der frühen Embryogenese sind drei Hauptcluster an *engrailed*-exprimierenden Zellen im sich entwickelnden Gehirn zu erkennen: an der Grenze zwischen den protocerebralen und deutocerebralen Anlagen, ein weiteres Cluster zwischen den Grenzen der deutocerebralen und tritocerebralen Anlagen und ein drittes Cluster zwischen der tritocerebralen Anlage und der subesophalen Anlage (Reichert und Boyan, 1997). Der Zentralkomplex, befindet sich im größten Teilbereich des Gehirns, im Protocerebrum, wo er als einzelne Einheit existiert. Ein weiterer Bestandteil des Protocerebrums sind die paarig angelegten Pilzkörper, die wiederum aus dem Calyx, dem Pedunculus und den Alpha-, Beta-, und Gammaloben zusammengesetzt sind. Mit den darin enthaltenen prominenten Kenyonzellen sind die Pilzkörper für assoziatives Lernen und Gedächtnisleistung verantwortlich. Auch die optischen

Loben, die aus Lamina, Medulla und Lobula Komplex bestehen, liegen paarförmig vor (Kurylas et al., 2008). Posterior zum Protocerebrum befinden sich Deutocerebrum und Tritocerebrum (Abbildung 1.4).



**Abbildung 1.4:** Dreidimensionale Darstellung des adulten Gehirns von *Schistocerca gregaria* in dorsaler Ansicht.

Quelle: Kurylas et al. (2008). Cell Tissue Res 333:125-145

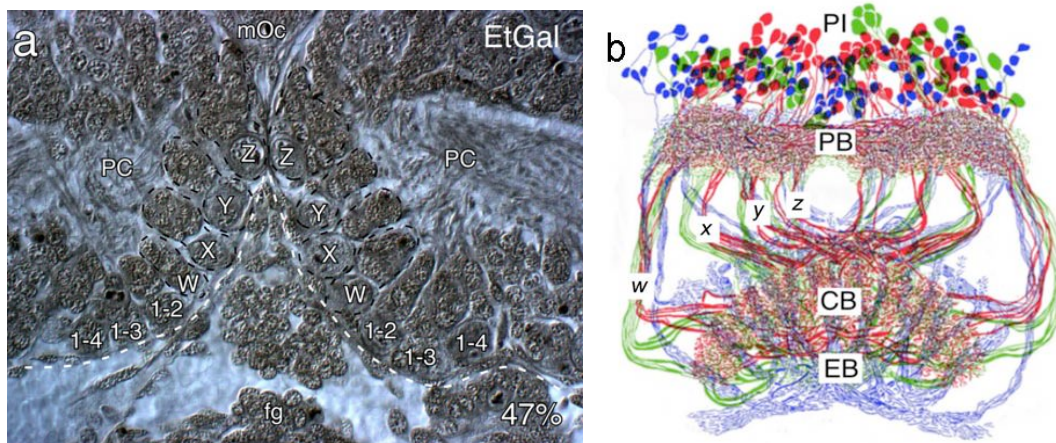
### Abkürzungen in Abbildung 1.4:

Ca Calyx. CC Zentralkomplex. DC Deutocerebrum. LAL lateraler akzessorischer Lobus. Lox Lobulakomplex. PC Protocerebrum. TC Tritocerebrum. Maßstab entspricht 600 µm

Das Protocerebrum entwickelt sich pro Hemisphäre aus 95 Neuroblasten die, wie im ventralen Nervenstrang, in sieben Reihen gegliedert sind (Boyan und Williams 2008). Diese Neuroblasten können als die neuronalen Stammzellen der Insekten angesehen werden (Ito et al., 1997; Izergina et al., 2009; Kriegstein und Alvarez-Buylla 2009; Boyan et al., 2010; Viktorin et al., 2011) und wandern aus dem Neuroektoderm ein. Aus den Neuroblasten können sich im Verlauf der Neurogenese sowohl Neurone als auch Gliazellen entwickeln. Die Zelllinien, die die Neuroblasten hervorbringen, werden durch Gliazellen räumlich eingegrenzt, was sie an einer Migration hindert (Boyan et al., 1995 a, b, c; Reichert und Boyan 1997). Vier dieser



erwähnten Stammzellen (Abbildung 1.5a) generieren im Laufe der Embryogenese pro Hemisphäre die Neurone, welche dann die typische säulenartige Neuroarchitektur des Zentralkörpers bilden (Boyan und Williams 1997; Williams et al., 2005). Diese Zelllinien bestehen jeweils aus ca. 120 bis 150 Zellen und werden der Typ II Zelllinie zugeordnet (Boyan et al., 2010). Durch eine assymetrische Teilung der Neuroblasten entstehen sogenannte intermediäre neuronale Vorläuferzellen (IPN). Diese IPN-Zellen bringen nun eine hohe Anzahl an Neuronen und Gliazellen hervor, da sie die Fähigkeit besitzen, sich selbst zu erneuern (Bello et al., 2008; Boone und Doe 2008; Bowman et al., 2008). Die entstandenen Neurone senden nun ihre in Faszikel gebündelten Axone über die sogenannten w, x, y, z Trakte in den Zentralkörper, was wie schon erwähnt die typische säulenartige Neuroarchitektur ergibt (Abbildung 1.5b) (Williams 1972, 1975; Vitzthum et al., 1996).



**Abbildung 1.5: Neuroblasten und ihre Lineages.**

Quelle: Boyan, Williams, Legl, Herbert (2010). Cell Tissue Res 341(2):259-77

Williams, Güntner, Boyan (2005). Arthropod Structure & Development 34 97–110

## Erklärung zu Abbildung 1.5:

**a** Gehirnschnitt bei 47%iger Embryogenese. Die osmium ethyl gallate Färbung (EtGal) zeigt den bilateralsymmetrischen Aufbau der mit dem Zentralkomplex assoziierten Neuroblasten in den beiden Hälften des Protocerebrums. Scale Bar=35 µm. **b** Schematische Darstellung des Zentralkomplexes mit den w, x, y, z-Trakten.

## Abkürzungen in Abbildung 1.5:

PI (Pars intercerebralis), PB (Protocerebrale Brücke), CB (Zentralkörper), EB (Elipsoidkörper), LAL (laterale Antennenloben), MAL (Mediale akzessorische Loben), w, x, y, z (Trakte). Pfeil zeigt in ventrale Richtung.

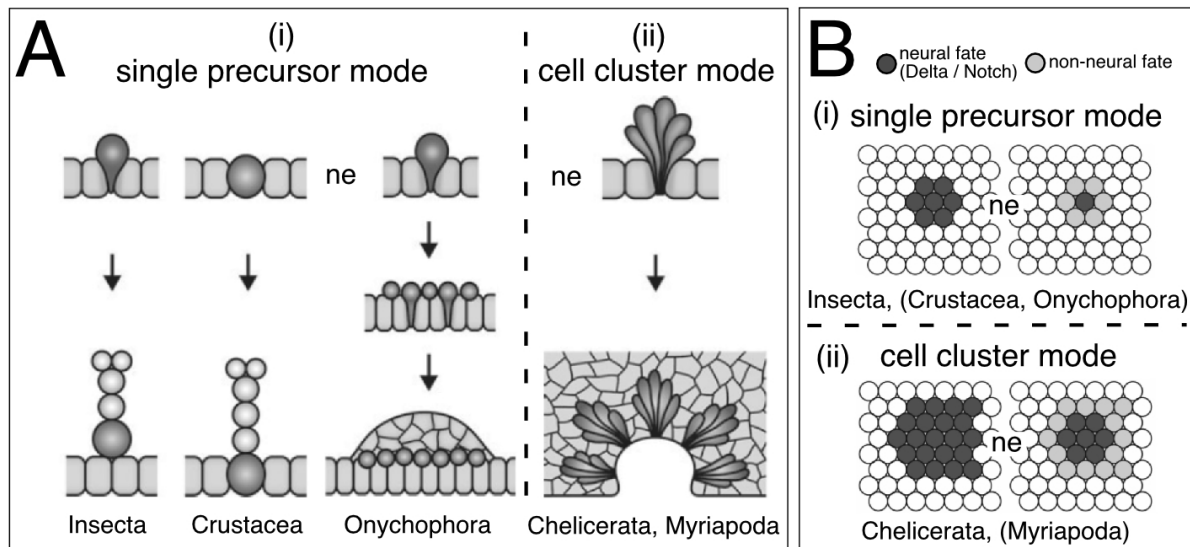
### 1.3 Der Zentralkomplex

Der Zentralkomplex, der als hochorganisiertes Assoziationszentrum des Insektengehirns angesehen werden kann, mit seinen nachgewiesenen Schlüsselrollen, sowohl für Sensorik- und Bewegungskoordination (Strauss 2002; Heinze und Homberg 2007; Strausfeld 2009) als auch für die räumlichen Erinnerung und Orientierung (Liu et al., 2006; Neuser et al., 2008), wird nach einem komplizierten molekularen Programm angelegt. Dessen Elemente werden zunehmend besser verstanden und werden somit zu einem neurobiologischen Modellsystem (Strauss et al., 1992; Strauss und Heisenberg 1993; Ilius et al., 1994; Reichert und Boyan 1997; Renn et al. 1999; Bello et al. 2008; Doe 2008; Bayraktar et al., 2010). Im Heuschreckenmodell werden die fünf Module des Zentralkomplexes (Protocerebrale Brücke, Zentralkörper, Ellipsoidkörper, Noduli, laterale akzessorische Loben, Abbildung 1.4) während der Embryogenese durch Vorläufer eines bestimmten Sets von Stammzellen, den so genannten Neuroblasten, generiert (Boyan und Williams 1997; Reichert und Boyan 1997; Williams et al., 2005).

In Panarthropoda wie in Insekten, Crustaceen und Onychophora beginnt die Neurogenese im embryonalen zentralen Nervensystem mit einer individuellen Vorläuferzelle und wird als single precursor mode bezeichnet (Abbildung 1.6A) (Mayer und Whittington, 2009). Diese Vorläuferzellen oder Neuroblasten delaminieren aus dem Neuroepithel an stereotypischen Orten in jedem Neuomer, so dass die Position in diesem Feld als Teil der Identität der Vorläuferzelle angesehen werden kann (Bate, 1976; Taghert et al., 1984; Doe und Goodman, 1985a,b; Doe und Technau, 1993; Zacharias et al., 1993; Goodman und Doe, 1994; Urbach et al., 2003a,b; Urbach und Technau, 2004) Die Vorläuferzelle selbst mit ihren Zelllinien kann dennoch als Klon angesehen werden (Doe und Technau, 1993; Ito et al., 1997; Lee und Luo, 2001; Bello et al., 2003; Ito und Awasaki, 2008; Sintoni et al., 2012).

Im Gegensatz dazu invaginieren beim cell cluster mode bei Chliceraten (Stollewerk, 2002; Stollewerk et al., 2001) und Myriapoden (Dove und Stollewerk, 2003) eher Zellcluster als individuelle Vorläuferzellen aus dem Neuroepithelium und werden dann direkt in das Nervensystem rekrutiert (Abbildung 1.6B). Somit kann ein Klon als komplettes Cluster an invaginierenden Zellen an einer bestimmten Stelle verstanden werden. Auch das Muster der Neurogenese unterscheidet sich in den

unterschiedlichen Methoden. Konservierte molekulare Mechanismen determinieren das Schicksal dieser Neuroepithelzellen (Stollwerk, 2002). Somit führt der Signalweg durch Gene (Delta/Notch) im single precursor mode zu einer Rekrutierung einer einzelnen neuronalen Vorläuferzelle aus einem Feld von zunächst gleichen Zellen (einem proneuralen Cluster) innerhalb der Neuroepithels der Insekten.



**Abbildung 1.6: Vergleich des single precursor modes und des cell cluster modes.**

Quelle: Boyan et al. (2015) Arthropod Structure & Development 44 (2015) 101-112

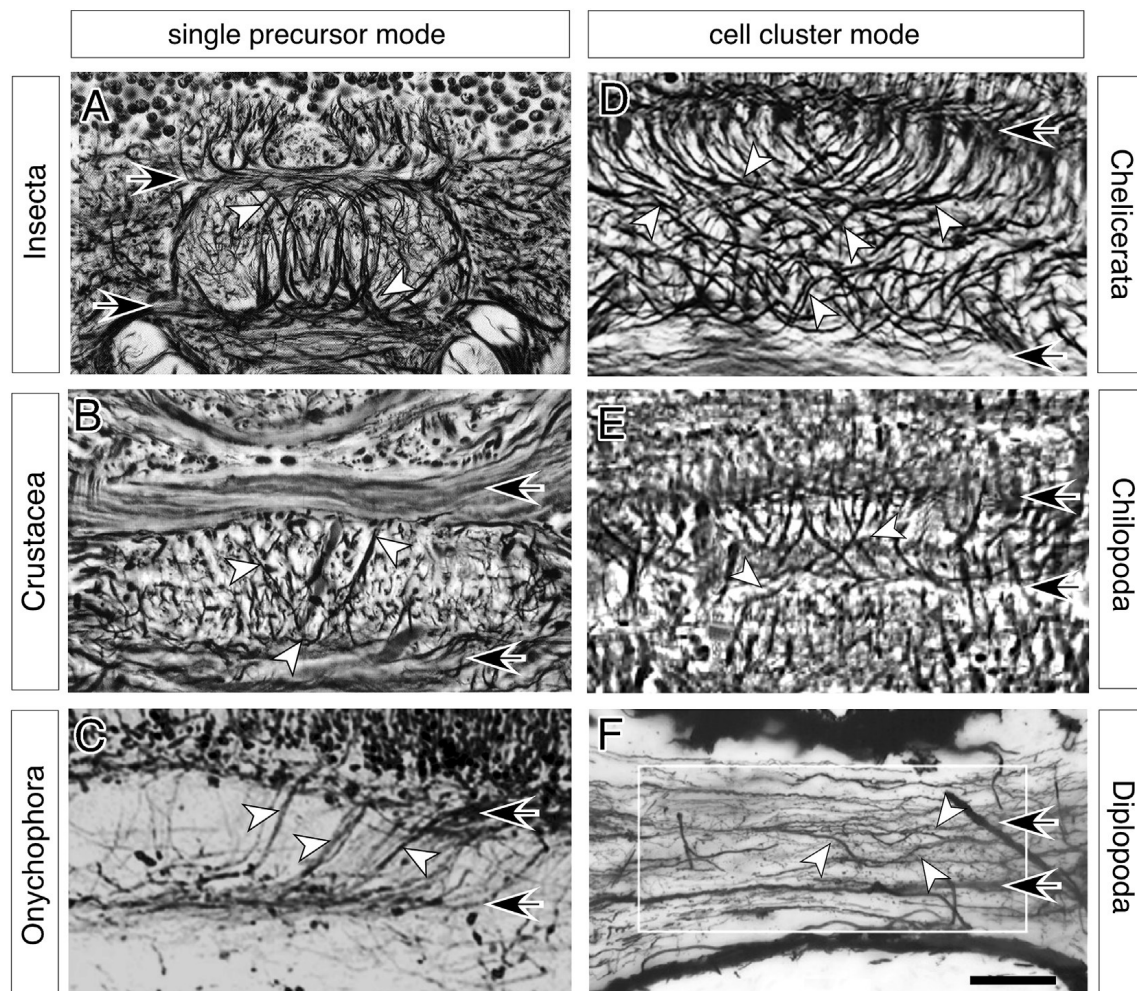
Topologisch ist der Zentralkomplex ein Teil des protocerebralen Neuromers des Gehirns. Wie bereits beschrieben wird der Zentralkomplex sowohl bei der Heuschrecke, als auch bei *Drosophila* durch ungefähr 100 bilateralsymmetrische Paare von Stammzellen (Neuroblasten) aufgebaut, welche individuell spezifiziert sind (Reichert und Boyan, 1997; Boyan und Reichert, 2011).

Funktionsgemäß ist der Zentralkomplex der Insekten in multimodaler Informationsverarbeitung involviert. Der Grad der Ausarbeitung in unterschiedlichen Spezies ist mit der Aufgabe der visuellen Navigation und Gedächtnisses sowie der Koordination des Bewegungsverhaltens wie Laufen, Fliegen und Stridulation involviert (Huber, 1960; Strauss und Heisenberg, 1993; Homberg, 1994, 2004; Strausfeld, 1999, 2012; Strauss, 2002; Mappes und Homberg, 2004; Liu et al., 2006; Heinze und Homberg, 2007; Neuser et al., 2008; Weinrich et al., 2008; Heinze et al.,



2009; Pan et al., 2009; Triphan et al., 2010; Homberg et al., 2011; Weir and Dickinson, 2012).

In Insekten, Crustacea und Onychophora, wo Neurone durch den single precursor mode (Abbildung 1.7A, B, C) generiert werden, ist die Kreuzung der Axone aus Zelllinien aus der Pars intercerebralis an stereotypischen Orten über die cerebrale Mittellinie deutlich zu erkennen. In Cheliceraten, Chilopoda und Diplopoda ist die Kreuzung der Axone von Neuronen, die durch den Zell cluster mode generiert (Abbildung 1.7D, E, F) werden ebenso deutlich. In Cheliceraten kommt es zu einer Wiederholung in aufeinanderfolgenden Ebenen, was in einer komplexeren Neuroarchitektur resultiert (Boyan et al., 2015).



**Abbildung 1.7: Topographische Kreuzung der Axone ist eine konservierte Neuroarchitektur der adulten cerebralen Mittellinie der Panarthropoda, ungeachtet ob die Neurone durch den single precursor mode (A-C) oder den cell cluster mode (D-F) generiert werden.**

Quelle: Boyan et al. (2015) Arthropod Structure & Development 44 (2015) 101-112

### Erklärung zu Abbildung 1.7:

Photomikrographische Darstellung von Gehirnschnitten des Mittelhirns von Insekten (A, Schnabelkerfe *Corixa*) von Crustaceen (B Fangschreckenkrebs *Lysiosquilla maculata*) und Stummelfüßer (C, *E. rowelli*) zeigen Axone (weiße Pfeilspitzen), die zwischen der anterioren (oben gelegene schwarze Pfeilspitze) und der posterioren (unten gelegene schwarze Pfeilspitze) Kommissur an stereotypischen Punkten kreuzen. In Cheliceraten (D, *Pardosa sp.*) und Chilopoda (E, *S. polymorpha*) ist die Kreuzung hervorstechend. In Diplopoden (F, *A. gigas*) ist die Kreuzung der Axone (weiße Pfeilspitzen) nur in einer rudimentären Phase entwickelt, so dass keine hoch organisierten neuropilen Strukturen an der Mittellinie gebildet sind (weißer Kasten).

Anterior zeigt nach oben und ist für alle Teilabbildungen gültig. Maßstab in A 50 µm; in B und C 60 µm; 35µm in D; 25µm in E; 55 µm in F.

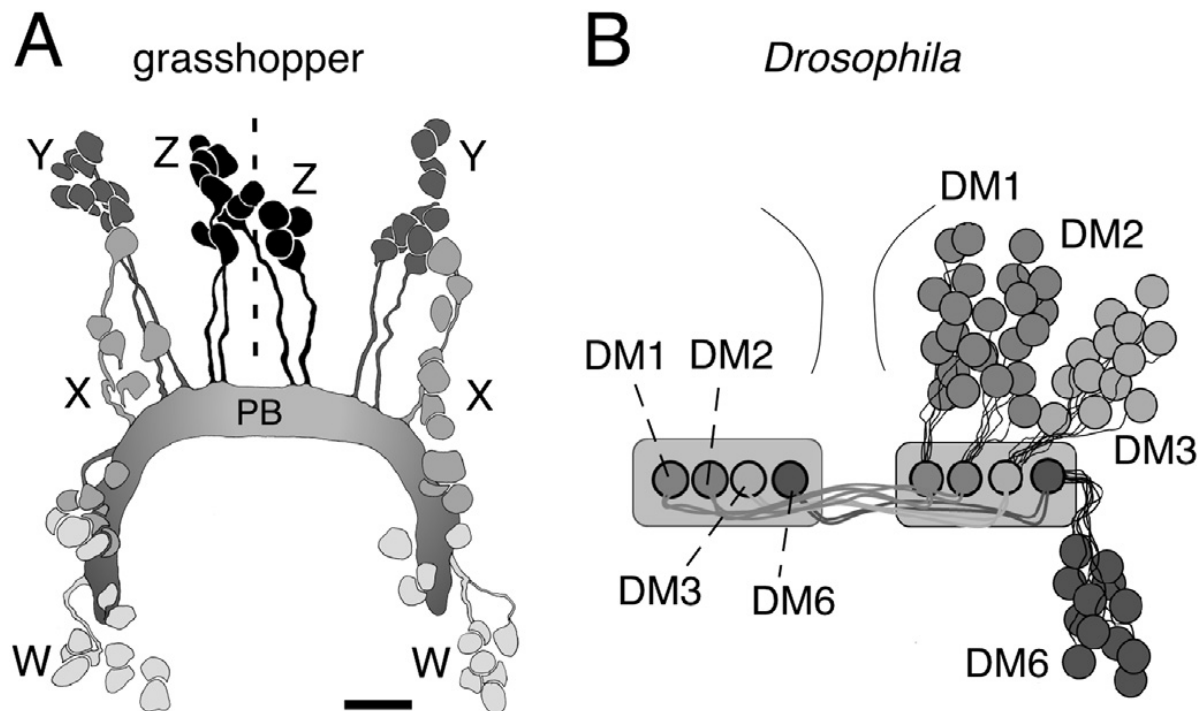
## 1.4 Entwicklung des Zentralkörpers

Die bekannteste Einheit der Module im Zentralkomplex ist der Zentralkörper. Dessen Neuroarchitektur ist in verschiedenen Insektenpezies, wie der Heuschrecke, *Drosophila*, Coleoptera (Wegerhoff et al., 1996), Collembola (Kollmann et al., 2011) und Diplura (Böhm et al., 2012). durch eine stereotypische Säulenarchitektur gekennzeichnet ist, welche durch Projektionen von Neuronen, die in der Pars intercerebralis in beiden cerebralen Hemisphären lokalisiert sind, charakterisiert wird (Abbildung 1.7).

Die anfängliche Organisation der Axone der cerebralen Mittellinie beinhaltet ein orthogonales Gerüst von Faserbündel, die um das Stomodeum angeordnet sind. Dieser Grundbauplan ist in frühen Embryonalstadien der Heuschrecke und *Drosophila* bemerkenswert ähnlich (Abbildung 1.9A, B) (Therianos et al., 1995). Eine Vielzahl an Studien deutet darauf hin, dass konservierte Mechanismen nicht nur in der Errichtung dieses grundsätzlichen axonalen Gerüsts in Arthropoden involviert sind (Thomas et al., 1984; Goodman und Doe, 1994; Whittington, 1995), sondern sogar in Vertebraten existieren (Arendt und Nübler-Jung, 1996; Leuzinger et al., 1998; Tomer et al., 2010)

Die Transformation dieses anfänglichen orthogonalen Grundplans in eine ausgereifte säulenförmige Neuroarchitektur beinhaltet eine topografische Kreuzung der Axone (in der Heuschrecke fascicle switching siehe Abb. 1.10), in der homologe cluster von Neuronen aus jeder protocerebralen Gehirnhälfte ihre Wachstumskegel zu

stereotypischen Positionen über die cerebrale Mittellinie hinaus neu ausrichten (Abbildung 1.8) (Boyan et al., 2008a; Young und Armstrong, 2010a,b).



**Abbildung 1.8: Muster der Zellcluster und Axonprojektionen von Zelllinien des Zentralkomplexes zur Entwicklung der Mittelhirnneuropile in der Heuschrecke und *Drosophila*.**

Quelle: Boyan et al. (2015) *Arthropod Structure & Development* 44 (2015) 101-112

#### Erklärung Abbildung 1.8:

Homologe Zellcluster, die aus homologen TypII Neuroblasten entstehen. Dies sind die einzigen Lineages im Gehirn, die intermediale neuronale Vorläufer besitzen (Boyan & Reichert, 2011).

**A:** Zeichnung eines Hirnschnittes zeigt Cluster Locustatachykininimmunreaktiver Zellen der W, X, Y, Z Zelllinien in jeder protocerebralen Hemisphäre (gestrichelte Linie) in einem späten Embryonalstadium der Heuschrecke. Axone projizieren über Trakte stereotypisch zur protocerebralen Brücke. (PB). **B:** Schematische Darstellung von Vorläufern der DM1, DM2, DM3, und DM6 Zelllinien in jeder protocerebralen Hemisphäre im dritten Larvenstadium von *Drosophila*. Projektionen dieses Clusters zum ursprünglichen fan-shaped body sind topographisch organisiert, mutmaßlich basierend auf einem transversalen molekularen Gradienten über die Mittellinie hinaus. Zu beachten ist die gleichartige Topologie der Zelllinien, und das vergleichbare Muster der Axonprojektionen zur Heuschrecke. Maßstab 30µm

Diese Neugestaltung ist Beweis, dass Entwicklungsmechanismen eine Neuroarchitektur so verwandeln können, dass sie sich veränderbaren Lebensgewohnheiten anpassen kann. Dies sogar innerhalb einer Lebensdauer eines

individuellen Organismus (Bullock und Horridge, 1965; Levine, 1984; Boyan und Ball, 1993; Lawrence, 1993; Sanes et al., 2012), und könnte daher auch evolutionär erhalten bleiben.

Mutationsanalysen in *Drosophila* (Strauss et al., 1992; Strauss und Heisenberg, 1993; Strauss, 2002; Triphan et al., 2010) wie auch Läsionsstudien in der Kakerlake bekräftigen die Rolle des Zentralkomplexes in Bewegungsmustern. Vergleichende Studien zeigen, dass der Zentralkomplex eine hoch ausgearbeitete neuroarchitektonische Struktur in diesen Insekten ist, welche komplexe Schrittmuster zum drehen und rennen entwickelten (siehe Strausfeld 1999).

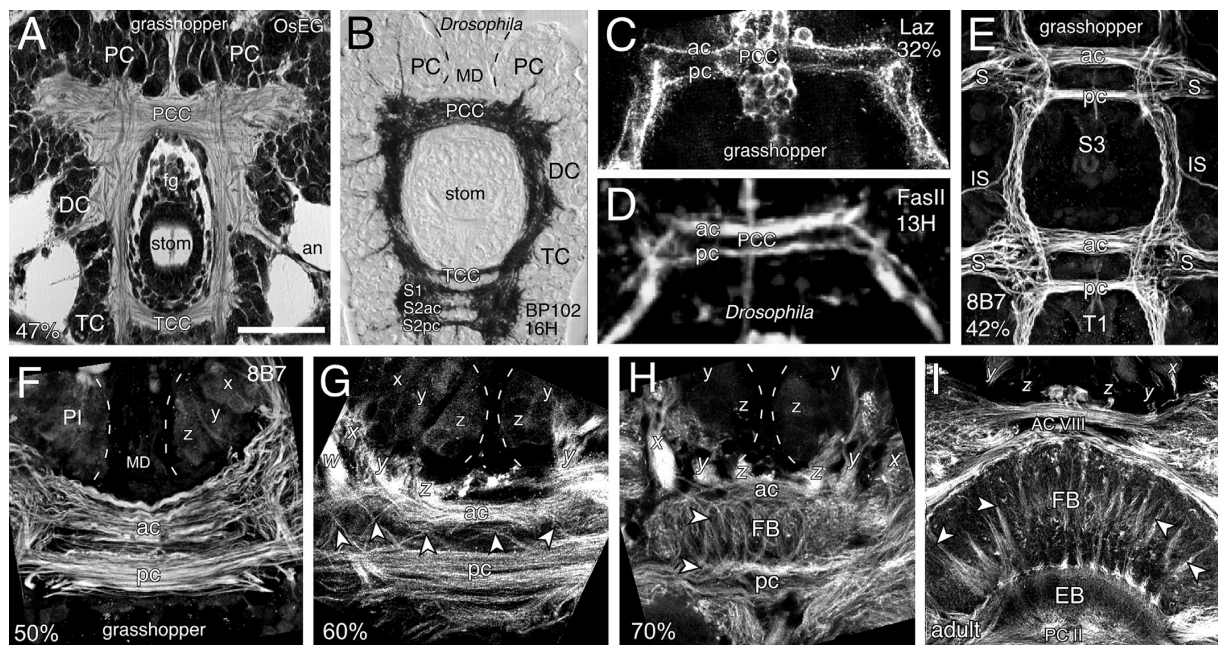
Entsprechend der Bewegungskontrollzentren im zentralen Nervensystem dieser hemimetabolen Insekten (Stevenson und Kutsch 1986) sind die Module des Zentralkomplexes zum Zeitpunkt des Schlüpfens einsatzbereit. Beim Modellsystem *Drosophila melanogaster* entspringen die gleichen Module des Zentralkomplexes aus einem komplementären Set aus Vorläuferzellen (Abbildung 1.8B). Im Vergleich zum Heuschreckenmodell (Abbildung 1.8A) geschieht dies jedoch erst am Ende des Larvenstadiums. Somit sind sie erst im adulten Tier einsatzbereit und werden deshalb auch, anders wie bei *Schistocerca gregaria*, als adultes Merkmal angesehen (Renn et al., 2008; Izergina et al., 2009; Young and Armstrong 2010a, b).

Betrachtet man das Bauchmark von Insekten, erkennt man pro Ganglion eine anteriore und eine posteriore Kommissur (Abbildung 1.9A, B, C, D, E).

Bei der Bildung des Gehirns von *Schistocerca gregaria* sowie bei der Bildung des Gehirns von *Drosophila* lässt sich, bei einem Entwicklungsstand von 50%, im Protocerebrum ebenfalls eine anteriore und posteriore Kommissur erkennen (Abbildung 1.9F) (Thomas et al., 1984; Whittington 1995). Diese beginnt in der Heuschrecke bei einem embryonalen Entwicklungsstand von 32% (Abbildung 1.9C) durch sogenannte primäre kommissurale Pionierneurone (PCP), und ist die erste von insgesamt 72 Kommissuren, die im Gehirn von *Schistocerca gregaria* gebildet werden (Boyan und Williams 2008). Fast identisch verhält es sich bei der Bildung des Gehirns von *Drosophila*. In Stage 13 Embryonen ist ebenfalls eine anteriore und posteriore Kommissur zu erkennen (Abbildung 1.9D). Sind die Kommissuren gebildet kreuzen die Wachstumskegel der PCPs die Mittellinie (Boyan et al., 2003) und

bahnen damit den Weg für die folgenden Axone und bereiten somit die Bildung des Zentralkörpers vor (Reichert und Boyan 1997).

Die Pionierneurone der w ,x ,y ,z Trakte projizieren, um die Mittellinie zu kreuzen, in das vorhandene System der Kommissuren hinein (Williams und Boyan 2008). Beim Entwicklungsstand von 60% kommt es zum sogenannten "fascicle switching" (Abbildung 1.9G; 1.10A-D). Einige Axone der w,-x-,y-,z-Trakte der anterioren Kommissur geben ihre Bündelung auf, überkreuzen die Mittellinie und beginnen Richtung der posterioren Kommissur zu wachsen. Sobald dies geschehen ist, kommt es zu einer Faszikulation mit der posterioren Kommissur. Durch die bilateralsymmetrische Anordnung der Faszikel entsteht nun eine chiasmatische Organisation. Dies ist bereits bei einem embryonalen Entwicklungsstand von 70% zu erkennen (Abbildung 1.9H) und ähnelt bereits dem modularen neuroarchitektonischen Aufbau des Zentralkörpers der adulten Heuschrecke (Abbildung 1.9I) (Boyan et al., 2008). Die Pionierneurone der w ,x ,y ,z Trakte halten ihre Verbindung mit der im Protocerebrum anterioren Kommissur (Williams und Boyan 2008).



**Abbildung 1.9: Die Umwandlung des primären Axongerüsts des Insektengehirns in eine chiasmale Neuroarchitektur.**

Quelle: Boyan et al. (2015) Arthropod Structure & Development 44 (2015) 101-112

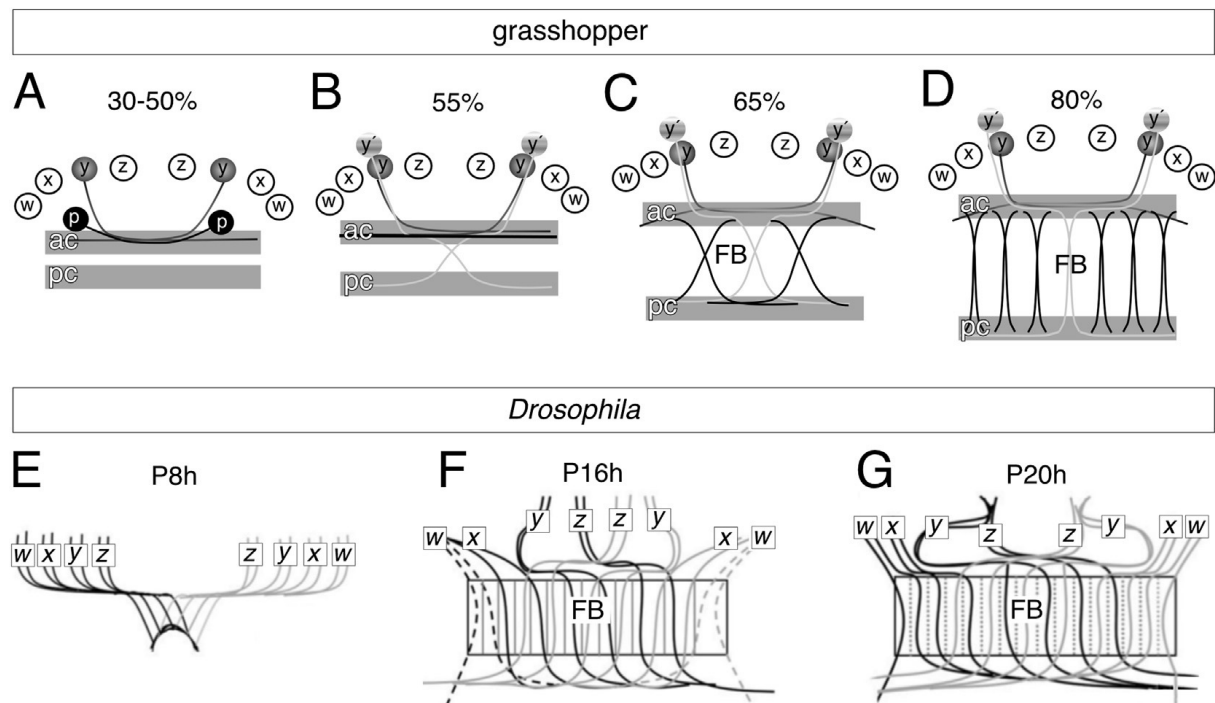
### Erklärung zu Abbildung 1.9:

**A:** Photomikrographische Aufnahmen eines Gehirnschnittes der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* bei einem embryonalen Entwicklungsstand von 47% nach erfolgter osmium ethyl gallate Färbung. Zu sehen sind ein orthogonales Gerüst der Kommissuren und longitudinale Projektionen der Fasern, welche das Stomodeum umrunden. Zu diesem Zeitpunkt ist noch keine chiasmale Neuroarchitektur zu erkennen. **B:** Konfokale Aufnahme eines Gehirnschnittes eines Stage 16 *Drosophila* Embryos nach erfolgter Färbung mit dem axonspezifischen Markers BP102. Wie im Heuschreckengehirn ist auch hier ein orthogonales Gerüst an Kommissurfasern und Longitudinalfasern um das Stomodeum zu erkennen. **C:** Konfokale Aufnahme der protocerebralen Mittellinie der Heuschrecke bei einem embryonalen Entwicklungsstand von 32% nach erfolgter anti-Lazarillo Färbung. Die primäre Kommissur mit den zwei Faszikeln ist klar deutlich zu erkennen. **D:** Konfokale Aufnahme eines Stage 13 Gehirns von *Drosophila* nach erfolgter anti-FasII Färbung zeigt eine fast identische Organisation der Kommissuren wie in der Heuschrecke in C. **E:** Konfokale Aufnahme des (Labial) S3 und ersten thorakalen (T1) Neuromers des Bauchmarks der Heuschrecke bei einem embryonalen Entwicklungsstand von 42% nach erfolgter Färbung mit dem axonspezifischen Marker 8B7. Die Fasern sind in einem orthogonalen System gruppiert, die anteriore und posteriore Kommissuren, sowie longitudinale Fasertrakte beinhalten. Zu beachten ist die Ähnlichkeit des Grundbauplans des Gehirns bei einem früheren Entwicklungsstand wie in C und D zu sehen. **F-I:** Fascicle switching führt zu einer kolumnären Neuroarchitektur im fan shaped body im embryonalen Heuschreckengehirn. Die Konfokalen Aufnahmen zeigen die cerebrale Mittellinie bei zunehmendem Alter der Embryonen nach erfolgter Färbung mit dem axonspezifischen Marker 8B7. **F:** Bei einem embryonalen Entwicklungsstand von 50% projizieren die Faserbündel, deren Ursprung in den protocerebralen Hemisphären liegt, via eines kommissuralen System über die Mittellinie, und bündeln sich in abgegrenzte Faszikel. Das fascicle switching ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht ersichtlich. Durch die Hintergrundfluoreszenz sind die Lineages (z, y, x) des Zentralkomplexes in der Pars intercerebralis der rechten protocerebralen Hemisphäre zu erkennen. **G:** Bei 60%iger Embryogenese ist eine Defaszikulation der Axone der Lineages des Zentralkomplexes, die über die bilateralen w, x, y, z Trakte in das kommissurale System eindringen, zu erkennen. Homologe Axone aus jeder Gehirnhemisphäre vollführen einen symmetrischen fascicle switch, so dass eine chiasmatische Ordnung an stereotypischen Positionen entsteht (weiße Pfeilspitzen). Anteriore und posteriore Faszikel verdichten sich und hinterlassen eine zentrale Lücke, die von den defaszikulierten Axonen umspannt ist. **H:** Bei 70%iger Embryogenese ist bereits eine kolumnäre Organisation, welche die Neuroarchitektur des fan shaped body charakterisiert, zu erkennen. Anteriore und posteriore kommissurale Faszikel driften immer noch weiter auseinander und das Volumen des Neuropils nimmt zu. Somit können die defaszikulierten Axone der Lineages des Zentralkomplexes über assoziierte Trakte zunehmend orthogonal projizieren (weiße Pfeilspitzen). **I:** Der Zentralkomplex im adulten Heuschreckengehirn mit seiner stereotypischen kolumnären Organisation der Fasern (weiße Pfeilspitzen), welche axonale Projektionen der w, x, y, z Trakte beinhalten und die anteriore (AC VIII) und posteriore (PC II) Kommissuren koppelt. Anterior ist in allen Abbildungen oben. Der Maßstab repräsentiert 105 µm in A; 25µm in B; 55 µm in C; 10 µm in D; 100 µm in E; 20 µm in F; 25 µm in G; 35 µm in H; 85 µm in I.

## Abkürzungen in Abbildung 1.9:

ac anteriore Kommissur. an Antennennerv. EB Ellipsoidkörper. FB fan shaped body. IS intersegmentaler Nerv. MD Mittellinie. OsEg osmium ethyl gallate. pc posteriore Kommissur. PCC protocerebrale Kommissur. S segmentaler Nerv. S1 Mandibularkommissur. S2ac anteriore Mixillarkommissur. S2pc posteriore Mandibularkommissur. S3 Labialneuromer. stom Stomodeum. TCC tritocerebrale Kommissur. T1 prothorakale Kommissur. VNC Bauchmark.

Im weiteren Verlauf der Embryogenese des Zentralkörpers wird deutlich, dass die Säulen des Zentralkörpers sich verdichten, da immer mehr Axone der in der Pars intercerebralis liegenden Neurone einwandern (Abbildung 1.9H,I; 1.10)



**Abbildung 1.10: Schematische Darstellung des konservierten Musters der Axonkreuzung im sich entwickelnden Gehirn der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* und *Drosophila*.**

Quelle: Boyan et al. (2015) Arthropod Structure & Development 44 (2015) 101-112

## Erklärung zu Abbildung 1.10:

Die Y Zelllinie dient hier als illustration des Musters des fascicle switching in der Heuschrecke. **A:** Bei einem embryonalen Entwicklungsstand zwischen 30 und 50% faszikulieren Pionierfasern der Y Zelllinie (y, dunkelgrau), welche in das anteriore Kommissursystem über den y Trakt eindringen mit kommissuralen Pionieren (p, schwarz), verbleiben jedoch mit ihrer ursprünglichen anterioren Kommissur assoziiert. **B:** Bei 55%iger Embryogenese switchen spätere Axone der Vorläufer (y', hellgrau) der Zelllinie, die den Pionieren in das Kommissursystem gefolgt sind, ihre Projektionen von einer anterioren zu einer posterioren Faszikulation über die Mittellinie. Dies tritt homolog für Axone aus

beiden Gehirnhemisphären auf. Somit kreuzen die Fasern an stereotypischen Positionen. **C:** Bei 65%iger Embryogenese wiederholt sich der Prozess des fascicle switching der Vorläufer aller vier Zelllinien (W, X, Y, Z) beider Hemisphären und führt zu einer Serie von Chiasmata. **D:** Bei einem embryonalen Entwicklungsstand von 80% koppelt die stereotypische Säulenorganisation der Fasern die anterioren und posterioren Faszikel innerhalb des Zentralkörpers. Die Säulen werden mehr und mehr orthogonal. Die anteriore und posteriore Kommissur trennt sich durch das Zunehmen der Verzweigungen im Zentralkörper. **E-G:** Muster der Projektionen von small-field Neuronen von zusammengefassten anti-Echinoid Färbungen zeigen die Kreuzung in *Drosophila* im Laufe der Entwicklung des Puppenstadiums. Die Kreuzungen der Axone folgen dem selben Muster wie in der embryonalen Heuschrecke. Die Zeit des Puppenstadiums wird in Stunden ausgedrückt. Die Interpretationen der Traktidentitäten (w, x, y, z) werden vom Heuschreckenmodell übernommen. **E:** Die Neurone aus der rechten Gehirnhemisphäre (grau) überlagern sich mit den Neuronen aus der linken Hemisphäre (schwarz). Beim Puppenstadium P8h sind Faserbündel, die als äquivalent zu den w, x, y, z Trakten in *Schistocerca gregaria* angesehen werden können, zur Mittellinie hin projiziert und kreuzen um die kolumnäre Organisation des fan shaped body zu initiieren. **F:** Zum Zeitpunkt P16h kreuzen Axone an spezifischen Positionen über die Mittellinie und bilden dabei die Säulen des fan shaped body. **G:** P20h. Die Faser projizieren topographisch durch den fan shaped body zu posterioren Neuropilen (nicht gezeigt).

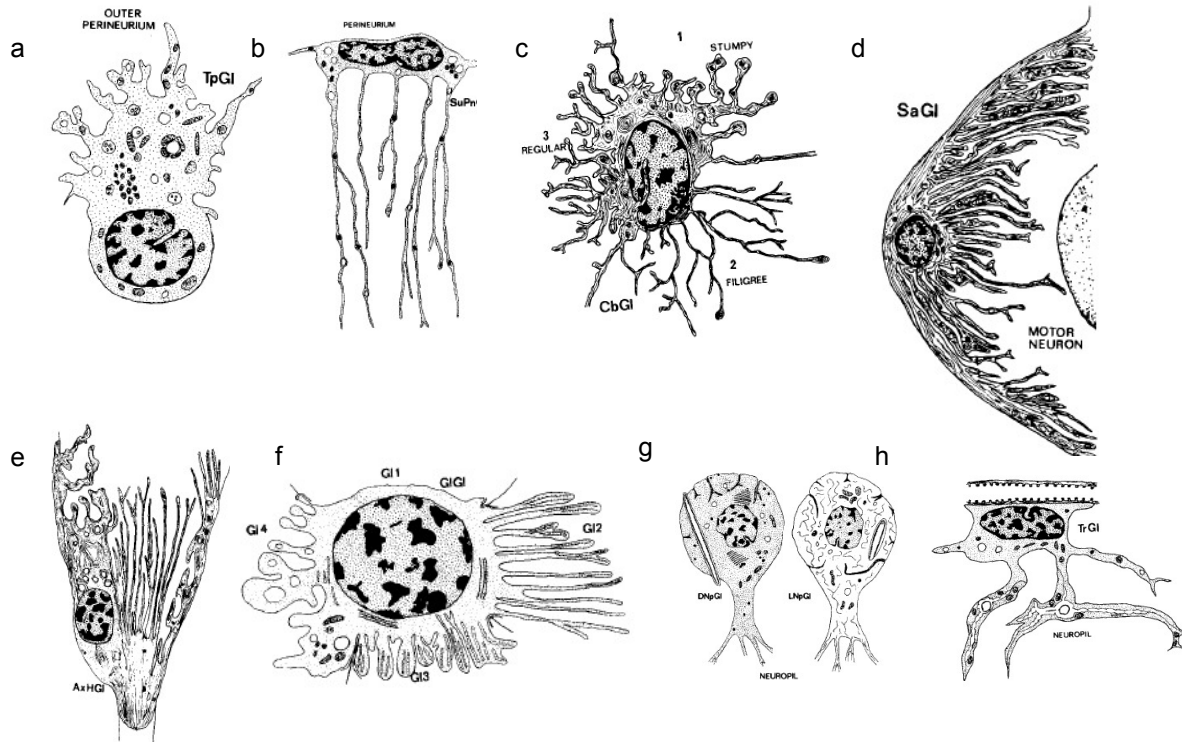
### **Abkürzungen in Abbildung 1.10:**

ac anteriore Kommissur. FB Zentralkörper (fan shaped body). p kommissurale Pioniere. pc posteriore Kommissur.



## 1.5 Gliazellen

Hoyle (1987) beschreibt in seiner Abhandlung über die Gliazellen das Auftreten verschiedener Arten im Bauchmark von Heuschrecken (Glial cells of an insect ganglion, 1987).



**Abbildung 1.11: Unterschiedliche Gliazelltypen im Bauchmark von Insekten**

Quelle: Hoyle G (1986) Glial cells of an insect ganglion. J Comp Neurol 246:85–103 (modifiziert)

Transportgliazellen (TpGl) (Abbildung 1.11a) sind im Perineurium lokalisiert und unterscheiden sich in ihrer Morphologie deutlich von echten Perineuriumzellen. Diese Gliazellen übernehmen die Aufgabe Material zu speichern und/oder altes Zellmaterial aufzulösen. Dieser Typ Gliazellen hat einen fast kugelförmigen Zellkern, eine flache innere Kontur sowie einen amöbenartigen äußeren Saum. Pseudopodienartige Projektionen scheinen eine Vielzahl einhüllender Projektionen in die Perineuriumzellen zu senden.

Ein weiterer Typ Gliazellen, die Hoyle in seiner Abhandlung beschreibt, sind die Subperineurialgliazellen (SuPnGl) (Abbildung 1.11b). Dieser Typ Gliazellen befindet sich innen nach den Perineuriumzellen. Der Zellkern dieses Typs ist gestreckt und

verläuft parallel zur Oberfläche des Ganglions. Lange dünne Projektionen dieses Zelltyps ziehen sowohl lateral unter das Perineurium sowie einwärts. Die Projektionen, die nach innen gerichtet sind, projizieren tief, bis zu 30  $\mu\text{m}$  in Zellkörper von Gliazellen, die mit Motoneuronen assoziiert sind. Die Morphologie dieses Zelltyps deutet darauf hin, dass Materialien an den Projektionen in andere Gliazellen transportiert werden.

Die in Abbildung 1.11c dargestellte Cell-body Gliazelle (CbGI) befindet sich nahe einzelner oder mehrerer Neuronsomata. Ein Teil der Oberflächenmembran ist mit anderen Gliazellen in Kontakt. Dieser Zelltyp beinhaltet innere Membranen und feines körniges Zytoplasma. Der Zelltyp erscheint in drei Unterklassen, die in regulär, stumpfförmig (stumpy) und filigran (filigree) eingeteilt werden. Der reguläre Typ besteht aus langen schlanken Ausstülpungen und besitzt feine Membranen und Granulä. Der stumpfförmige Typ ist eher kurz und breit in seiner Erscheinung. Der filigrane Typ ist außergewöhnlich lang und dünn.

Der Zellkörper eines Motoneurons im Bauchmark von Insekten ist mit einer oder mehreren Gliazellen des Zelltyps Satellite Glia (SaGI) verknüpft (Abbildung 1.11d), welche speziell mit nur einem Neuron assoziiert sind. Lange reziproke Projektionen erstrecken sich soweit wie möglich zum Zellkern beider Zellen, der Gliazelle und des dazugehörigen spezifischen Motoneurons.

Axon hillock glia (AxHGL) (Abbildung 1.11e) sind Gliazellen, die mit einem großen Motoneuron assoziiert sind. Dieser Typ Gliazellen besitzt einzigartige lange parallele kammartige Einstülpungen, die mit dem Axonhügel verbunden sind. In der Nähe des Somas besitzt dieser Gliazelltypus stumpfförmige reziproke Einstülpungen. Abgesehen von einigen wenigen Stellen körnigen Zytoplasmas ist die gesamte Gliazelle mit äußeren Membranen bestückt.

Ein weiterer Typ Gliazellen, den Hoyle (1987) beschreibt, sind sogenannte Glia Glia (GIGI) (Abbildung 1.11f). Ungefähr die Hälfte aller Gliazellen im Insektenganglion kontaktieren keine Neurone sondern andere Gliazellen. Die Einstülpungen dieses Gliazelltyps variieren von einfachen glatten Oberflächen bis hin zu hoch komplexen tiefen reziproken Einstülpungen. Wie in Abbildung 1.11f dargestellt ist, kann dieser

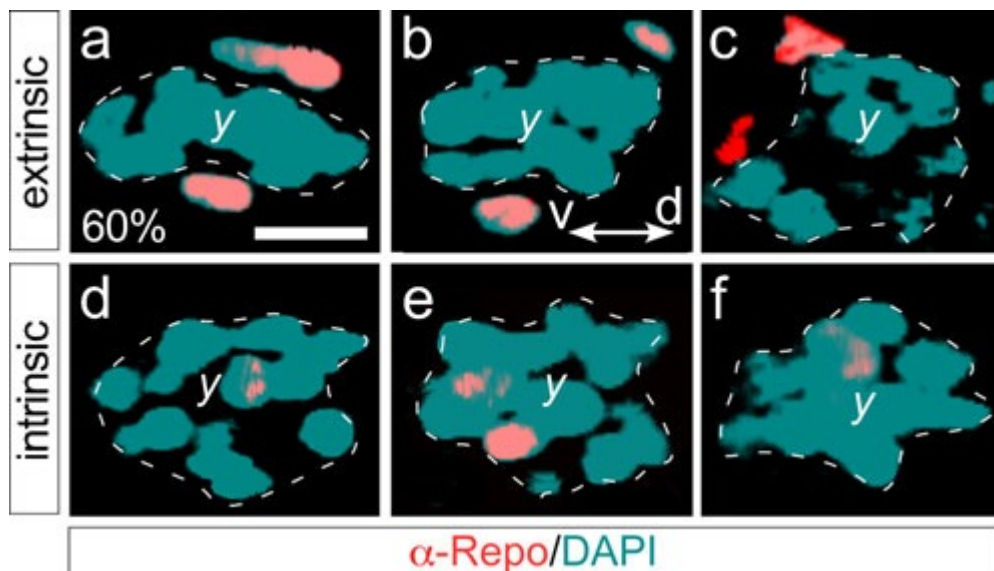
Typ Gliazelle vier unterschiedliche Kontaktstellen zu anderen Gliazellen ausbilden (GI1-4)

Das gesamte Neuropil des Insektenganglions ist umrundet von einer Schicht Gliazellen, deren Zytoplasma sich nach innen verlängert. Dieses Zytoplasma verzweigt sich in außerordentlich dünnen (10 µm) Projektionen. Diese Verzweigungen umwickeln oder projizieren zwischen neuropilen Dendriten. In Abbildung 1.11g sind zwei unterschiedliche Arten dieses Typs Neuropilgliazellen (NpGI) dargestellt. Die Mehrheit dieses Typs Gliazellen beschreibt Hoyle als hell in ihrer Erscheinung und nennt sie daher light neuropil glia (LNpG1). Der zweite Typ dieser Neuropilgliazellen besitzt dunklere Granulae und wird von Hoyle als dark neuropil glia bezeichnet (DNpG1).

Gliazellen, die mit der Bildung von Tracheen oder Tracheolen innerhalb eines Ganglions in Verbindung stehen, sind die sogenannten Tracheal glia (TrGI) (Abbildung 1.11g). Diese Kategorie Gliazellen kann nicht präzise spezifiziert werden, da Tracheen die meisten Arten von Gliazellen durchziehen. Da Tracheolen durch Einstülpungen der Oberflächenmembran gebildet werden, kann jede Gliazelle, in deren Zytoplasma eine Tracheole erscheint, als trachel glia bezeichnet werden. Somit sind manche Gliazellen des Typs NpGI wahrscheinlich TrGI Zellen, können jedoch nur als solche bezeichnet werden, falls ihr inneres Zytoplasma gefärbt wird und eine Tracheole beinhaltet.

Betrachtet man die Entstehung der Gliazellen in den bereits erwähnten W ,X ,Y ,Z Lineages genauer, erkennt man, dass es unterschiedliche Regionen innerhalb dieser Zelllinien gibt, die Gliazellen hervorbringen. So konnten durch eine anti-Repo Färbung Gliazellen identifiziert werden, die innerhalb der Zelllinie in sogenannte lineage-intrinsic glia und lineage-extrinsic glia unterschieden werden (Abbildung 1.12) (Liu und Boyan 2013). Der Unterschied hierbei liegt in der Lage dieser Gliazellen, wobei die lineage-intrinsic glia innerhalb der Zelllinien zu finden sind (Abbildung 1.12d-f). Die Zellen, die als lineage-extrinsic glia bezeichnet werden, sind eher am äußeren Rand der Zelllinien zu finden (Abbildung 1.12a-c) und grenzen diese gegeneinander ab. Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der Entwicklung beider Gliazelltypen, ist zu erkennen, dass die Anzahl der Gliazellen bei beiden Typen zwischen 40 und 60%iger Embryogenese steigt, und im weiteren Verlauf der

Embryogenese (nach 60%) wieder abnimmt. Diese Abnahme der Gliazellen innerhalb der Zelllinien lässt auf eine Migration der Gliazellen schließen, da keine Apoptose zu beobachten ist (Liu und Boyan 2013). Vergleicht man die Entwicklung der Zelllinien im Bezug auf die Gliazellen zwischen *Schistocerca gregaria* und *Drosophila melanogaster*, liegt der größte Unterschied im zeitlichen Ablauf der Entstehung der Gliazellen. Bei *Schistocerca gregaria* liegt die Zunahme der Gliazellen zwischen 40%iger und 60%iger Embryogenese. Da *Drosophila melanogaster* ein holometaboles Insekt ist, findet die Gliazellentwicklung in den Zelllinien, die zum Aufbau des Zentralkomplexes beitragen postembryonal statt (Viktorin et al. 2011).



**Abbildung 1.12: Verteilungsmuster extrinsischer und intrinsischer Gliazellen einer repräsentativen Zelllinie (y) in apikaler Ansicht.**

Quelle: Liu und Boyan (2013) Dev Genes Evol 223(4):213-23

### Erklärung zu Abbildung 1.12:

Z Stacks der y Zelllinie wurden bei 60%iger Embryogenese rotiert und optisch wiederholt geschnitten um eine innen liegende Sicht zu bieten. a-c: Bei allen drei unterschiedlichen gezeigten Tiefenprofilen sind Repo exprimierende Zellen zu erkennen, welche außen liegend mit der Zelllinie assoziiert sind. d-f: In diesen dargestellten unterschiedlichen Tiefenprofilen sind Repo exprimierende Gliazellen innerhalb der Zelllinie verteilt.

Ventral (v) und dorsal (d) der Zelllinien sind in b dargestellt und gelten für alle Teilabbildungen. Masstab in a entspricht 15µm und gilt für alle Teilabbildungen

In beiden Modellsystemen erzeugen die Zelllinien des Zentralkomplexes sowohl Neurone als auch Gliazellen (Ito et al., 1997; Izergina et al., 2009; Boyan et al., 2010; Viktorin et al., 2011). Die neuronalen Vorläuferzellen in der Heuschrecke senden Projektionen zur protocerebralen Brücke durch die so genannten w ,x ,y ,z Trakte.

Die glialen Vorläuferzellen grenzen diese Zelllinien ein und spalten diese in die beschriebenen w ,x ,y ,z Trakte auf (Boyan et al., 1995; 2010). In der Tat spielen Gliazellen eine bedeutende regulatorische Rolle bei der Bildung der Neuroarchitektur des gesamten Nervensystems der Insekten. Gliazellen grenzen Zelllinien im Bauchmark gegeneinander ab (Doe und Goodman 1985a, b; Seaver et al., 1996), sind bei der Führung der Axone involviert (Bastiani und Goodman 1986; Jacobs und Goodman 1989; Klämbt und Goodman 1991; Therianos et al., 1995; Noordermeer et al., 1998; Rangarjan et al., 1999; Pielage und Klämbt 2001; Poeck et al., 2001; Sepp et al., 2001; Sepp und Auld 2003; Hidalgo 2003; Learte und Hidalgo 2007), regulieren die Organisation der Mittellinie des Zentralnervensystems (Klämbt et al., 1991, Goodman und Doe 1994; Sonnenfeld und Jacobs 1995; Scholz et al., 1997; Page 2004), bilden die Blut-Hirnschranke (Hoyle 1986; Carlson et al., 2000; Peraanu et al., 2005), und grenzen die einzelnen Neuropile im Gehirn, wie z.B. den Zentralkomplex, die Pilzkörper und die Antennenloben, gegeneinander ab (Oland und Tolbert 1987, 1989; Breidbach et al., 1992; Hähnelin und Bicker 1996, 1997; Oland et al., 1999; Peraanu et al., 2005). Durch Mutationsanalysen wurden Signale von Gliazellen identifiziert, welche das Regulieren zwischen dem entwicklungsbedingten Schicksal von Gliazellen und Neuronen (Condrón et al., 1994; Klaes et al., 1994; Hosoya et al., 1995; Jones et al., 1995), die Kontrolle der Proliferation der Neuroblasten (Ebens et al., 1993), die Neuronale Differenzierung (Buchanan und Benzer 1993), das Überleben der Neurone (Booth et al., 2000), und die neuronale Degeneration (Kretschmar und Pflugfelder 2000) gewährleisten. Ist das Nervensystem vollständig entwickelt, üben Gliazellen unterstützende Funktionen auf Neurone aus, indem sie die Neurone isolieren, die ausgeschütteten Transmittermoleküle recyceln, als Zellen des Immunsystems tätig sind und Stoffwechselprozesse regulieren (Gocht et al., 2009).

### 1.5.1 Gliazellen des Gehirns

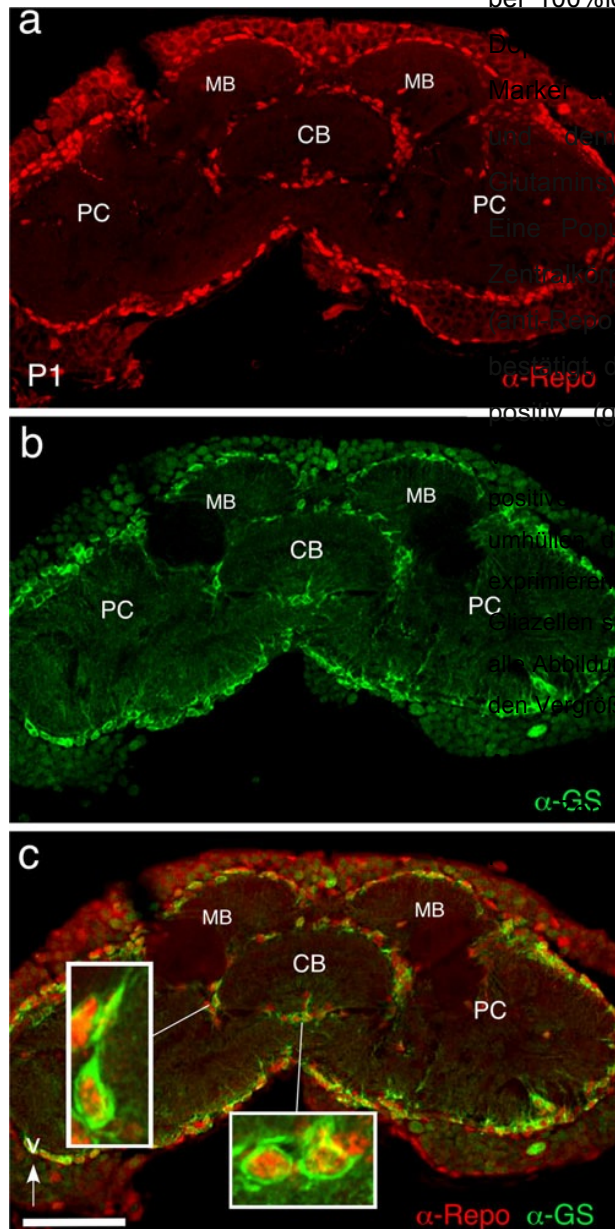
Will man die Gliazellen des zentralen Nervensystems, speziell im Insektengehirn genauer klassifizieren muss man noch weitere Unterscheidungen vornehmen. So muss man zwischen peripheren Gliazellen, Oberflächengliazellen, Kortextgliazellen und Neuropilgliazellen unterscheiden. Wie die einzelnen Namen der unterschiedlichen Gliazellen schon verdeutlichen, ist diese Beschreibung auf die Lage der Zellkörper und deren Morphologie zurückzuführen (Ito et al., 1994; Freeman und Doherty 2006; Parker und Auld 2006). 2008 etablierte Awasaki et al. eine Unterteilung der Gliazellen des Gehirns in fünf Untergruppen. Danach werden Oberflächengliazellen in Perineurialglia- und Subperineurialgliazellen unterteilt. Des Weiteren wird zwischen Kortextgliazellen und Neuropilgliazellen unterschieden, wobei im Falle der Neuropilgliazellen nochmals zwischen einhüllenden und astrozytenähnlichen Gliazellen unterschieden wird. Die besagten Neuropilgliazellen üben entscheidenden Einfluss bei der Kompartimentalisierung von neuropilen Strukturen im Insektengehirn aus. Zudem sind sie bei der Interaktion zwischen Gliazellen und Neuronen involviert.

Ein grundlegender offensichtlicher Aspekt bei der Untersuchung der Interaktion von Gliazellen und Neuronen während der Entwicklung beinhaltet die Identifizierung der Gliazellen im Nervensystem, z.B. durch gliaspezifische Marker (Klaes et al., 1994; Xiong et al., 1994; Halter et al., 1995; Hosoya et al., 1995; Jones et al., 1995; Noordermeer et al., 1998; Edenfeld et al., 2006). Der universellste dieser Marker, das Homöoboxgen *reversed polarity (repo)* (Xiong et al., 1994; Halter et al., 1995) wurde angewandt um eine Karte der Gliazellen im Gehirn von *Drosophila* (Ito et al., 1994; Hartenstein et al., 1998; Pereanu et al., 2005) zu erstellen und um die Assoziierung der Gliazellen mit dem Neuropil des Zentralkomplexes in der Honigbiene aufzuzeigen (Hähnelin und Bicker 1997). Wie schon erwähnt, ist *repo* ein Gen, welches ein Protein mit einer Homeodomäne transkribiert. Da es in allen Gliazellen exprimiert wird, dient es als Regulator bei der Transkription von Genen (Xiong et al., 1994; Halter et al., 1995). Repo ist nicht zuständig für die Festlegung des Zellschicksals (Halter et al., 1995) sondern wird, nachdem die Zelle ihre Identität als Gliazelle erhalten hat, downstream vom Transkriptionsfaktor Glia Cells Missing aktiviert (Granderath et al., 2000). Beruhend auf der Tatsache, dass Repo ein Transkriptionsfaktor ist, und somit an die kleine Furche der DNA bindet, ist es nur im

Zellkern zu finden. Das größte Hindernis bei der Untersuchung der Entwicklung der Neuropile durch Repo ist, dass das Expressionsmuster von Repo normalerweise keine Gliaprozesse (Abbildung 1.13a) aufzeigt. Dadurch wird eine zelluläre Analyse der Gliazellinteraktion mit Neuronen - welche bei Insekten bis jetzt größtenteils durch Elektronenmikroskopie gezeigt wurde - unterbunden (Vanhems und Girardie 1983; Bastiani und Goodman 1986; Hoyle 1986; Oland und Tolbert 1987, 1989; Vanhems und Delbos 1987; Carlson und Saint Marie 1990; Cantera und Trujillo-Cenoz 1996; Oland et al., 1999). Um die bereits erwähnte Kompartementalisierung der Neuropile durch Gliazellen und die Interaktion zwischen Gliazellen und Neurone zu untersuchen und sichtbar zu machen, ist es daher notwendig, einen Marker zu finden, der nicht nur die Somata sondern auch die Ausläufer der Gliazellen, die Gliapodien, markiert.

### 1.6 Glutaminsynthetase

In dieser Arbeit wurde die Expression des Enzyms Glutaminsynthetase in Ergänzung zu dem gliaspezifischen Marker Repo etabliert, um Gliazelltypen zu charakterisieren, welche mit der Entwicklung des Zentralkomplexes der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* einhergehen. Solche Gliazellen gehören zu der Gruppe der so genannten Neuropilgliazellen, welche wiederum weiter in umhüllende Gliazellen und astrozytenähnliche Gliazellen unterteilt werden können (c.f. Awasaki et al., 2008). Glutaminsynthetase kommt in solchen Zellen kortikal zum Ausdruck, und zeigt folglich deren Prozesse und nicht nur die Zellkerne, wie im Falle von Repo, auf (Abbildung 1.13b).



a-b: Konfokale Bilder des gleichen Horizontalschnittes durch das Protocerebrum bei 100%iger Embryogenese nach erfolgter Deponierung mit dem gliaspezifischen Marker Anti-Repo (a,  $\alpha$ -Repo roter Kanal) und dem astrozytenspezifischen Marker Glutaminsynthetase (b,  $\alpha$ -GS, grüner Kanal). Eine Population an Zellen umrundet den Zentralkörper. c: Die Überlagerung des roten (anti-Repo) und grünen (anti-GS) Kanals bestätigt, dass diese Zellen GS-positiv/Repo-positiv (gelb) gefärbt sind. Die beiden Kanäle in c zeigen, dass alle GS-positiven Zellen (grün), die den Zentralkörper umhüllen, den gliaspezifischen Marker Repo (rot) exprimieren und daher astrozytenähnliche Gliazellen sind. Pfeil zeigt nach ventral und ist für alle Abbildungen gültig. Maßstab 170  $\mu$ m in a-c; in den Vergrößerungen 23  $\mu$ m.

#### Legende in Abbildung 1.13:

CB Zentralkörper. MB Pilzkörper. PC Protocerebrum.

**Abbildung 1.13: Gliazellen grenzen das Neuropil des Zentralkörpers im Mittelhirn bei *Schistocerca gregaria* ein.**

Quelle: Boyan, Williams, Götz (2013) Cell Tissue Res. 351 (3): 361-72

Im Vertebratengehirn ist Glutaminsynthetase ein gliaspezifischer Marker (Martinez-Hernandez et al., 1977; van der Hel et al., 2005), vor allem für Astrozyten (Ward et al., 2004), und wurde auch in gliaähnlichen Zellen im Gehirn von Crustaceen entdeckt (Harzsch und Hansson 2008). Da das Enzym Glutaminsynthetase auf der Oberfläche von Gliazellen im Invertebratengehirn sitzt (Awasaki et al., 2008; Boyan et al., 2010), kann damit eine Charakterisierung der Gliazellen vorgenommen werden. In der vorliegenden Arbeit wird anhand einer Doppelfärbung gezeigt, dass

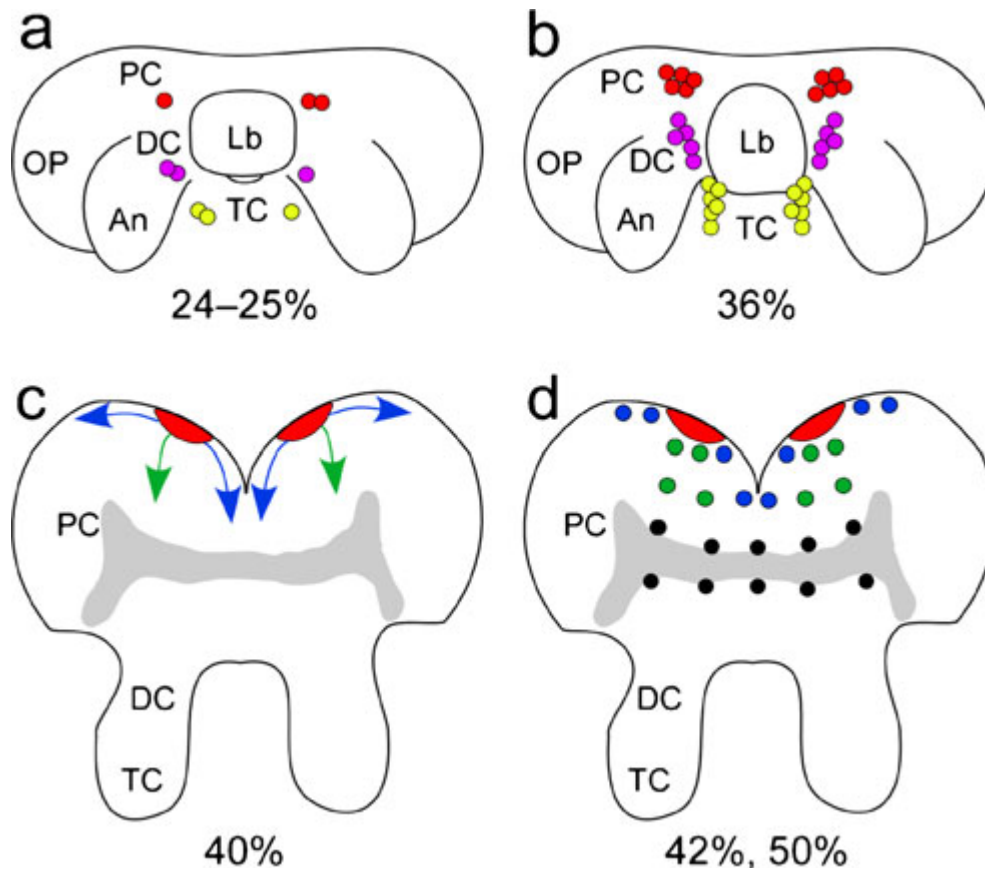


alle glutaminsynthetase positiven Zellen, welche mit dem Zentralkomplex assoziiert sind, auch positiv für den gliaspezifischen Marker Repo sind (Abbildung 1.13c) (Xiong et al., 1994; Halter et al., 1995). Dagegen sind sie negativ, was den neuronspezifischen Marker Meerrettichperoxidase (HRP) (Jan und Jan 1982; Haase et al., 2001) betrifft. Dies bekräftigt die Vermutung, dass es sich um Gliazellen handelt.

Homberg (2002) konnte zeigen, dass auch in den Säulen des Zentralkörpers Glutamat als Neurotransmitter vorhanden ist. Bei Vertebraten wird dieser nach Freisetzung in den synaptischen Spalt von Gliazellen, mit Hilfe eines exzitatorischen Aminosäuretransportes (EAAT2 und EAAT4) aufgenommen. Das Enzym Glutaminsynthetase, das wie schon erwähnt auf den Oberflächen von Gliazellen sitzt, wandelt nun Glutamat und Ammoniak zu Glutamin um, und leistet hiermit seinen Beitrag zur Entgiftung und zum Recyclen der Transmittermoleküle (van der Hel et al., 2005). Nachdem dieser Umwandlungsprozess vollzogen ist, werden die recycelten Transmittermoleküle wieder zurück in die Neurone transportiert. Diese Tatsache spricht für eine neuromodulatorische Funktion der Gliazellen und deren Gliapodien, die im Laufe der Embryogenese zunehmend dichter und verzweigter werden und somit mit den Synapsen innerhalb der neuropilen Struktur des Zentralkomplexes in Kontakt stehen.

### **1.7 Ontogenese und Entwicklung der Gliazellen im Heuschreckengehirn**

Bei 25%iger Embryogenese ist in jeder der beiden Gehirnhälften ein Cluster von Zellen, welche Repo exprimieren, zu erkennen (Abbildung 1.14a). Diese Cluster nehmen im Verlauf der weiteren Entwicklung an Größe zu (Abbildung 1.14 b), indem sie immer mehr Gliazellen involvieren. So nehmen im Verlauf der Embryogenese (33%-39%) diese Cluster ihren Bestimmungsort im Protocerebrum ein und formen das anteriore Ende des Protocerebrums, den Kortex und jene Stellen wo sich später die primären Kommissuren bilden werden (Abbildung 1.14c, d) (Liu 2013).



**Abbildung 1.14: Schematische Darstellung des Musters der Gliazellen im embryonalen Gehirn von *Schistocerca gregaria* zu unterschiedlich Entwicklungsstufen.**

Quelle: Liu (2013) Cell Tissue Res (2013) 354:697-705

#### **Erklärung zu Abbildung 1.14:**

**a:** Bei einem embryonalen Entwicklungsstand zwischen 24 und 25% erscheinen in jedem protocerebralen (roter Kreis) deutocerebralen (violetter Kreis) und tritocerebralen Neuromer Gliazellen als kleine Cluster die ein oder zwei Repo exprimierende Zellen beinhalten. **b:** Bei 36%iger Embryogenese nimmt die Anzahl der Gliazellen in den Clustern zu. **c:** Die anterior liegenden Cluster (rote Region) bei 40%iger Embryogenese könnten Oberflächen und Kortexgliazellen hervorbringen (blaue Pfeile Oberflächengliazellen, Kortexgliazellen grüne Pfeile). Die Pfeile zeigen die möglichen Migrationsrouten solcher Gliazellen. **d:** Zwischen 42 und 50%iger Embryogenese sind proliferative Gliazellen an der Oberfläche (blaue Kreise, im Kortex (grüne Kreise) und an den neuropilen Regionen des Gehirns präsent. die graue Region in **c, d** zeigt sich entwickelnde Neuropile im Protocerebrum.

#### **Abkürzungen in Abbildung 1.14**

An Antennen. DC Deutocerebrum. Lb Labrum. OP optischer Lobus. PC Protocerebrum.

## 1 Einleitung

Gliazellen (grün) wandern in die Region der Faserbündel

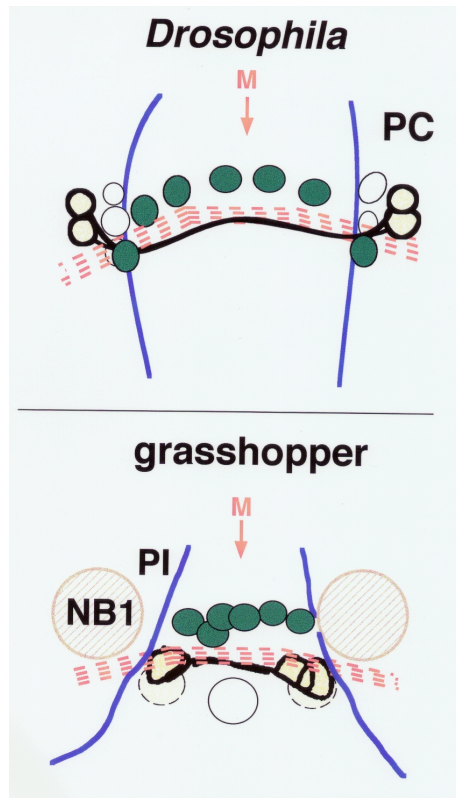
(rot) und bilden eine Unterteilung in anteriore und

posteriore Faserbündel.

Diese Unterteilung in anteriore und posteriore Faserbündel wird sowohl bei der

Heuschrecke als auch in *Drosophila* durch einen "glia sling" gewährleistet (Reichert und Boyan, 1997), wobei Gliazellen in die besagte Region migrieren, in der sich die

Faserbündel formen (Abbildung 1.15) (Page, 2004).



**Abbildung 1.15:** Schematische Darstellung der Entwicklung der Faserkommissuren durch einen "glia sling" in einem frühen Entwicklungsstadium in *Drosophila* und Heuschrecke.

Quelle: Boyan et al. (2015) Arthropod Structure & Development 44 (2015) 101-112

Im Laufe der Embryogenese bei 50%igem Entwicklungsstand findet man im Heuschreckengehirn eine große Anzahl an Gliazellen, die durch den gliaspezifischen Marker Repo sichtbar gemacht werden können. Wie auch im Gehirn von *Drosophila melanogaster* (Awasaki et al., 2008; Hartenstein 2011) können diese Gliazellen in Gruppen klassifiziert werden: Oberflächengliazellen, Kortexgliazellen und Neuropilgliazellen (Gocht et al., 2009)

Es wurde anhand verschiedener Insektenpezies gezeigt, dass die Proliferation solcher Gliazellen in den Prozess der Gliogenese im sich entwickelnden Gehirn involviert ist (Nordlander und Edwards 1969; Vanhems 1985; Oland und Tolbert

1989; Cayre et al., 1996; Hähnleib und Bicker 1997; Hartenstein et al., 1998; Pereanu et al., 2005; Izergina et al., 2009; Hartenstein 2011; Viktorin et al., 2011; Liu und Boyan 2013). Proliferative Gliazellen wurden überall im Protocerebrum des Heuschreckengehirns zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien noch vor der Mid-embryogenese identifiziert. Während manche der Gliazellen Cluster mit nicht proliferativen Gliazellen bilden, die am anterioren Ende des Protocerebrums lokalisiert sind, werden anderen Gliazellen gemäß ihrer Lokalisation in die besagten verschiedenen Klassen unterteilt.

Des Weiteren konnte sowohl im Gehirn von *Drosophila melanogaster* (Hartenstein et al., 1998; Hartenstein 2011) wie auch im Gehirn von *Locusta* (Vanhems 1985) gezeigt werden, dass die Gliagenese zur Migration der Gliazellen aus den Clustern in das sich entwickelnde Hirn beiträgt. So bilden z.B. gliale Vorläuferzellen in *Drosophila* verschiedene Cluster, welche das Gehirn eingrenzen und im weiteren Verlauf der Embryogenese durch Migration in das Gehirn einwandern.

Im Gehirn von *Schistocerca gregaria* erscheinen die Gliazellen als kleine Cluster in jeder Hemisphäre des Gehirns. Solche segmental verteilten Muster der Gliazellen bleiben im weiteren Verlauf der Entwicklung bestehen, während sich jedes dieser Gliazellcluster durch Zunahme der enthaltenen Gliazellen, wahrscheinlich durch Proliferation, ausdehnt. So findet die Verteilung der Repo-exprimierenden Zellen im Protocerebrum parallel zum Anstieg der Gliazellen statt. Betrachtet man z.B. den Entwicklungsschritt zwischen 33% und 40% der Embryogenese, findet man ein Cluster Repo-exprimierender Zellen am anterioren Ende des Protocerebrums, während die Gliazellen, die im Cortex und im Bereich der sich entwickelnden primären neuropilen Kommissur bei Embryonen im Alter von 33% im weiteren Verlauf der Entwicklung weit im Protocerebrum verteilt sind (Liu 2013).

Die Cluster der Gliazellen im Protocerebrum der Heuschrecke, die am anterioren Ende jeder Hemisphäre lokalisiert sind, beinhalten proliferative und nicht proliferative Gliazellen, die sowohl Oberflächengliazellen als auch Kortextgliazellen bilden. Dies impliziert, dass Migration und Proliferation in die Entwicklung der Oberflächengliazellen und auch der Kortextgliazellen im Protocerebrum von *Schistocerca gregaria* involviert sind. Die Neuropilgliazellen im Protocerebrum von *Schistocerca gregaria* entstehen in gleicher Weise aus proliferativen Gliazellen, die

entlang der Neuropile verteilt sind. Jedoch wurde bis zum heutigen Forschungsstand noch kein Cluster von Vorläuferzellen für die besagten Neuropilgliazellen entdeckt.

Im Unterschied dazu entspringen beim Modellsystem *Drosophila* die Vorläuferzellen der Oberflächengliazellen und der Kortexgliazellen des Gehirns aus 2 Haupt- und mehreren kleinen Cluster, welche das embryonale Gehirn flankieren. Die meisten Zellen der Neuropilgliazellen des frühen Larvengehirns von *Drosophila* entspringen aus einem Cluster von glialen Vorläuferzellen, das als BPLG bezeichnet wird, und das an der Grenze zwischen Tritocerebrum und Deutocerebrum im embryonalen Gehirn lokalisiert ist (Hartenstein et al., 1998).

## 2 Ziele und Fragestellung der Arbeit

Es wurde gezeigt, dass Gliazellen eine wichtige Rolle bei der Bildung der Neuroarchitektur, das ganze Nervensystem der Insekten betreffend, spielen (für Reviews siehe Hidalgo 2003; Klämbt 2009). Da die verschiedenen Typen der Gliazellen bekannt sind (siehe Hoyle 1986; Jones 2001; Edwards und Meinertzhagen 2010), sind die, welche die Gehirnneuropleie begrenzen (Oland und Tolbert 1987, 1989; Breidbach et al., 1992; Hähnlein und Bicker 1996, 1997; Oland et al., 1999; Pereanu et al., 2005; Awasaki und Lee 2011; Boyan et al., 2011) von besonderem Interesse um die Entwicklung des Zentralkomplexes zu studieren. Zu dieser Gruppe gehören die astrozytenähnlichen Gliazellen, welche bei Vertebraten in glutaminerge synaptische Transmissionen einbezogen sind (van der Hel et al., 2005; Takahashi et al., 2010). Bei Insekten haben diese Gliazellen beträchtliche dendritische Projektionen (oder Gliapodien), die in die Neuropilregionen, wie den Zentralkomplex ziehen (Awasaki et al., 2008; Awasaki und Lee 2011; Boyan et al., 2011). Eine Struktur, die in der Heuschrecke glutaminerge Rezeptoren aufweist (Homborg 2002). Ein Teil dieser Arbeit beschäftigt sich nun mit der zellulären und molekularen Charakterisierung der Gliazellen, die mit dem Zentralkörper assoziiert sind.

Weiter wird der Frage nachgegangen, ob diese Gliazellen des Zentralkomplexes der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* im Laufe der Entwicklung untereinander ein Netzwerk bilden über das sie kommunizieren. Um dies herauszufinden, wurden Versuche zur Zellkopplung bei astrozytenähnlichen Gliazellen, die mit dem Zentralkomplex assoziiert sind, zu einem Zeitpunkt, bei dem sich das Neuropil formt (70%iger Entwicklungsstand), und kurz nach dem Schlüpfen der Embryonen (100%iger Entwicklungsstand) durchgeführt. Durch die Dyeinjektion in eine einzelne Zelle an einer der vier ausgesuchten Stellen um den Zentralkomplex wurde eine Ausbreitung zu einer Population benachbarter Gliazellen gezeigt, deren Zahl und räumliche Verteilung stereotypisch für jede Seite des Zentralkomplexes ist. Dies ist in beiden Embryonalstadien (70% und 100%) vergleichbar. Die Zugabe von *n*-Heptanol in das Puffermedium verhindert jegliche Zellkopplung, übereinstimmend, dass diese Gliazellen über gap junctions miteinander kommunizieren. Vergleiche der Daten aller Stellen dieser Zellkopplungsversuche deuten darauf hin, dass der sich entwickelnde Zentralkörper von einem Netzwerk solcher Gliazellen, die durch Zellkopplung miteinander verbunden sind, umrundet ist. Dieses Netzwerk könnte als ein

Positionierungssystem funktionieren, welches die sich entwickelnden Neuropile des Zentralkomplexes innerhalb des Gehirns begrenzt.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Haltung und Aufzucht

Die Tierhaltung und sämtliche Experimente wurden unter Einhaltung der von der Deutschen Forschungsgemeinschaft herausgegebenen Richtlinien durchgeführt.

Gemäß der fünf Larvenstadien und dem folgenden adulten Stadium werden die verwendeten Versuchstiere *Schistocerca gregaria* in einer hauseigenen Zucht getrennt voneinander in sechs Käfigen gehalten. Um den Tieren eine möglichst habitatnahe Umgebung zu simulieren, wird darauf geachtet, die Temperatur der Käfige in der hauseigenen Zucht am Tage auf konstant 30°C, und in der Nacht auf konstanten 20°C zu halten. Zudem wird darauf geachtet, dass die Luftfeuchtigkeit bei 35% liegt. Ein geregelter zwölfstündiger Tag-Nacht-Rhythmus wird durch eine Zeitschaltuhr gewährleistet. Aus einer Sprühflasche werden täglich mehrere Sprühstöße mit Wasser an die Käfigwand abgegeben, wodurch den Tieren ermöglicht wird ihre Homöostase zu regulieren.

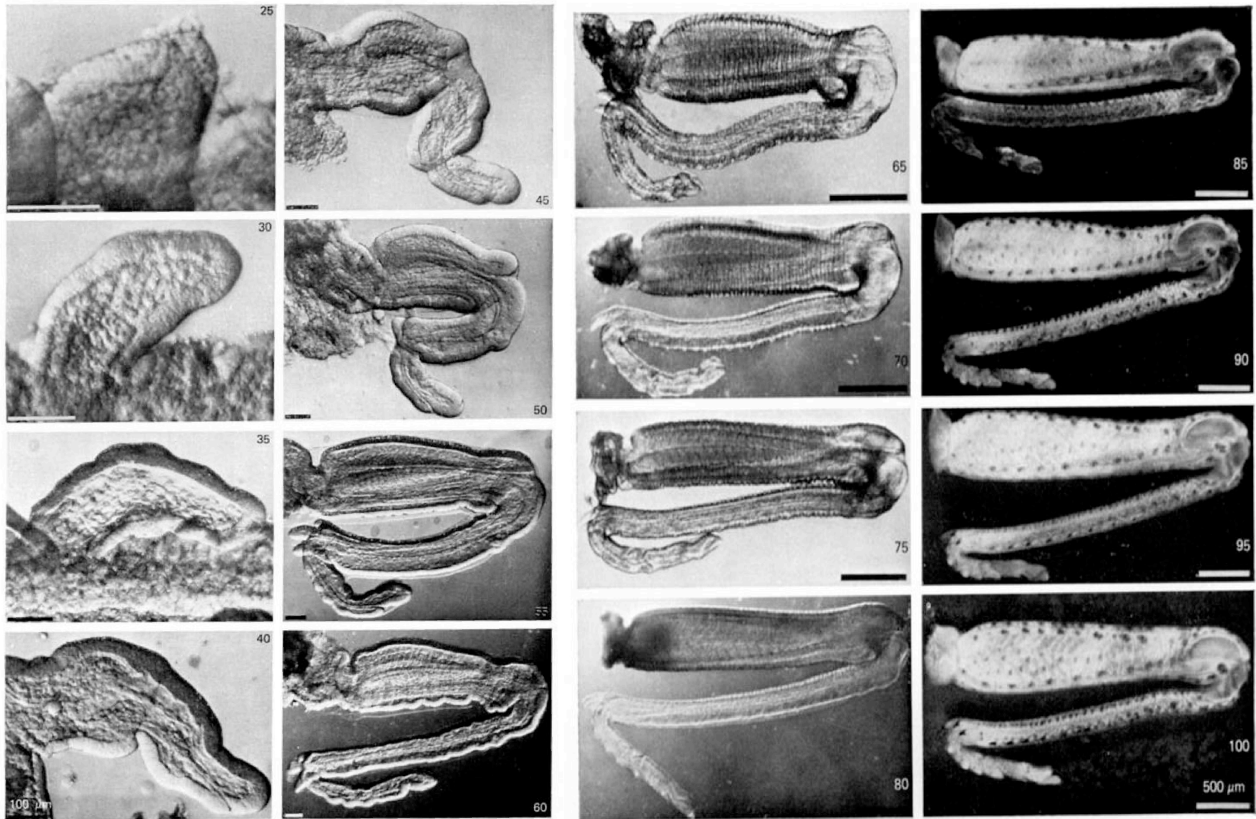
Um die Zucht aufrecht zu erhalten, muss eine hohe Populationsdichte der adulten Tiere gewährleistet sein. Durch die daraus bereits erwähnte resultierende Serotoninausschüttung befinden sich die Heuschrecken permanent in der gregären Phase, welche zur Paarungs- und Fortpflanzungsbereitschaft führt. Wenn die genannten Bedingungen gewährleistet sind, legen die Weibchen ca. 20-80 Eier enthaltenen Pods 2 – 3 Zentimeter unter eine Schicht Vermiculit, die den Tieren in einer Plastikbox zur Verfügung steht. Die gelegten Eier, welche zur Stabilisierung in Schaumsäulen verpackt sind, werden immer an den gleichen Tagen (zwei Mal pro Woche) und ebenfalls in eine, mit Vermiculit gefüllte Plastikschaale, in einen Brutschrank überführt. Da sich die Tiere pro Tag um etwa 5% entwickeln, schlüpfen sie nach 20 Tagen und werden dann in den ersten Käfig überführt. Somit ist gewährleistet, dass sich in den einzelnen Käfigen immer Tiere mit gleichem Entwicklungsstand befinden. Zur Nahrungsaufnahme wird den Tieren täglich eine Schüssel Haferflocken und zusätzlich ausgekeimter Weizen, der ebenfalls aus der hauseigenen Zucht stammt, zur Verfügung gestellt.



### 3.2 Altersbestimmung der Versuchstiere

Da sich die Experimente in der hier vorliegenden Arbeit mit der Entwicklung des Zentralkomplexes befassen, ist es von großer Wichtigkeit, das richtige Alter der Versuchstiere vor der Präparation zu bestimmen. Dies wird nach der von Bentley et al., (1979) etablierten Methode durchgeführt. Mit dieser Methode bestimmt man anhand der morphologischen Entwicklung der Beinanlagen bei *Schistocerca nitens* das Alter der Embryonen (Abbildung 3.1). Da *Schistocerca nitens* ein sehr naher Verwandter der Wüstenheuschrecke *Schistocerca gregaria* ist, kann diese Methode durchaus zur Altersbestimmung herangezogen werden. Zusätzlich zu dieser Methode gibt auch die Lage der Embryonen im Ei und dessen Dotterfüllmenge, sowie die Pigmentierung der Komplexaugen und der Beinanlagen Aufschluss über das jeweilige Alter der Embryonen.

Die Altersbestimmung der Postembryonalstadien lässt sich durch die Häutung des Chitinpanzers bestimmen, da sich die Tiere im ersten Larvenstadium nach 5 Tagen das erst Mal häuten. Die Häutungen der folgenden Postembryonalstadien benötigen, unter den genannten Bedingungen, sechs Tage. Nach der letzten Häutung haben die Tiere das adulte Stadium erreicht, wobei es noch 16–18 Tage dauert bis die Tiere ihre Geschlechtsreife erlangen.



**Abbildung 3.1:** Altersbestimmung anhand der Beinanlagen von *Schistocerca nitens* in 5%igen Entwicklungsschritten beginnend bei 25%.

Quelle: Bentley, Keshishian, Shankland, Torian-Raymond (1979). J Embryol Exp Morphol 54:47–74

### 3.3 Präparationen

Will man die Entwicklung des Zentralkomplexes untersuchen, muss man, um an die betreffende im Protocerebrum liegende Region zu gelangen, die Gehirne der Versuchstiere präparieren und sie auf die im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte vorbereiten. Da es sich hauptsächlich um embryonale Insekten handelte, war eine Narkose nicht erforderlich. Bei allen Versuchen mit Larven oder adulten Insekten jedoch wurde das Tier vorab entweder durch Kälte oder CO<sub>2</sub>-Zufuhr voll narkotisiert. Die Präparation der Gehirne erfolgt in einer Präparationsschale, die mit Eis gekühlt wird und zuvor mit 0,1 M PBS gefüllt wurde. Da die Embryonen sich noch in ihrer Eihülle befinden, wird diese vorsichtig unter zu Hilfenahme zweier Mikropipetten geöffnet. Im Anschluss daran entfernt man den Kopf mit einer Präparationsschere. Hat das Tier ein Alter zwischen 60% und 70% erreicht, öffnet man die abgetrennten Köpfe mit einer Mikropipette um das Gehirn vollständig zu

präparieren. Es ist darauf zu achten, Tracheen und Fettgewebe vor der Überführung in das Fixativ vom Gehirn zu entfernen, da diese dem Gewebe im Fixativ Auftrieb verleihen. Dadurch könnte es zu einer unvollständigen Fixierung des Gewebes, und sogar, durch die Oberflächenspannung des Fixativs, zu Deformationen am Gewebe kommen. Will man den Entwicklungsstand eines jüngeren Tieres untersuchen (< 60%) fixiert man die ganzen, vom Körper abgetrennten Köpfe. Hierbei muss man lediglich den Kopf zwischen den Augen öffnen, so dass das Fixativ in den Kopf, und somit auch in das Gehirn, eindringen kann.

### **3.4 Fixierung**

Die meisten histologischen Untersuchungen setzen eine Fixierung des Gewebes voraus. Die am weitesten verbreitete Art der Fixierung beruht auf einem neutral gepufferten Fixativ, dessen Inhaltsstoffe auf einer Aldehydbasis, wie z.B. Paraformaldehyd, besteht. Dies führt zu einer irreversiblen Quervernetzung der Proteine im Gehirn und dadurch zu einer festeren und gleichzeitig elastischeren Konsistenz des gesamten Gewebes (Liddell und Weeks, 1996). Da bei immunhistochemischen Färbungen nicht jeder Antikörper bei den verschiedenen Fixativen funktioniert, wurde in dieser Arbeit auf Bouin und Paraformaldehyd (PFA) zurückgegriffen.

#### **3.4.1 Bouin (wässrig)**

Bouin besteht aus den Bestandteilen Pikrinsäure (75%), Paraformaldehyd (21%) und Eisessig (4%). Auf die Fixierung mit Bouin wurde zurückgegriffen wenn die Präparate gegen Glutaminsynthetase gefärbt wurden, da sich dies im Laufe der Arbeit als beste Alternative zum Paraformaldehyd herausstellte. Sobald die Gehirne, bzw. die Köpfe präpariert waren, wurden sie in Bouin überführt und über Nacht bei 4° C auf einem Schüttler fixiert.

#### **3.4.2 Paraformaldehyd (PFA)**

PFA ist das kurzkettige Polymer des Formaldehyds. Es führt zu Quervernetzungen (Veresterung) der basischen Aminosäure Lysin untereinander. Um eine 3,7%ige Ausgangslösung an PFA zu erhalten, wurde 0,5 ml einer 37%igen Stammlösung

PFA in 4,5 ml 0,1 M PBS gelöst (1:10). Sobald die Gehirne präpariert waren, wurden diese wieder in das Fixativ überführt, anders als bei der Fixierung mit Bouin jedoch nur für 1 Stunde bei Raumtemperatur.

#### **3.5 Einbetten der Präparate**

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Methoden des Schneidens der Präparate angewandt. Zum einen wurden die Präparate an einem Vibratom (Leica VT 1000 S) mit einer Dicke von 50 µm, zum anderen an einem Cryostat (Leica cm3050s) mit einer Dicke von 18 µm geschnitten. Die unterschiedlichen Schneidetechniken verlangen dementsprechend unterschiedliche Einbettmedien, die dem Präparat zusätzliche Stabilität beim Vorgang des Schneidens und gleichzeitig eine größere Angriffsfläche für das jeweilige Schneidewerkzeug bieten.

Sowohl für die immunhistochemische Untersuchung, als auch für die morphologische Untersuchung einzelner Zellen mittels Dye-Injection, wurden die Präparate mit einem Vibratom geschnitten, was ein Einbetten in Agarose voraussetzt. Agarose ist ein Polysaccharid ( $C_{12}H_{18}O_9$ ) aus D-Glucose und 3,6-Anhydro-L-galactose, die glykosidisch miteinander verbunden sind. Um eine 5%ige Agaroselösung zu erhalten wurde stets 0,5 g Agarose in 10 ml 0,1 M PBS in einem Wasserbad bei 60° C gelöst, da Agarose bei Raumtemperatur einen festen Aggregatzustand hat. Sobald die Agarose in einem zähflüssigen Zustand vorliegt werden die fixierten Gehirne aus dem Fixativ unter Zuhilfenahme eines Spatellöffels in einen kleinen Schnappdeckel transferiert, um sie dann in Agarose einzubetten. Sobald die Gehirne mit Agarose bedeckt sind, werden sie unter einem Binokular entsprechend der gewünschten Schnittrichtung ausgerichtet. Nach erfolgreicher Einbettung und Ausrichtung der Gehirne im Agaroseblock wird dieser mit PBS überschichtet, um ein Austrocknen zu vermeiden. Um zu garantieren, dass die Agarose vollständig aushärtet, werden die überschichteten Agaroseblöcke für 1 Stunde bei 4° C gelagert, um sie anschließend am Vibratom mit einer Dicke von 50 µm zu schneiden.

Für die Untersuchung der Zellkopplung und der damit einhergehenden Injektionsversuche wurden Schnitte, die mit Hilfe eines Cryostat erzeugt wurden, benötigt. Die Gehirne wurden wie oben beschrieben präpariert. Nach erfolgter Präparation werden die unfixierten Gehirne zunächst für 5 Minuten in einer 1%igen

Methylenblaulösung (PBS) eingelegt um sie später, sowohl bei der Ausrichtung im Tissue Tek (Tissue Freezing Medium Jung) wie auch im anschließenden Prozess des Schneidens zu erkennen. Nach erfolgter Färbung der Gehirne in der erwähnten Methylenblaulösung werden sie sofort in spezielle, aus Silikonkautschuk gefertigte, Einbettungsgießformen überführt und ausgerichtet, welche bereits mit Tissue Tek gefüllt wurden. Tissue Tek ist ein Gefriermedium, welches, überführt man es in 2-Methylbutan, sofort den Aggregatzustand von zähflüssig in gefroren ändert. Ist das Tissue Tek durchgefroren, werden die Gehirne am Cryostat mit einer Dicke von 18 µm geschnitten und sofort auf Superfrost Objektträger, welche auf -18° C gefroren sind, aufgezogen.

### **3.6 Immunhistochemie**

Mit Hilfe der Methode der immunhistochemischen Färbung, bzw. der Immunfluoreszenz können gezielt ganze Zellen, Proteine oder deren Transkriptionsfaktoren durch Bindung eines Antikörpers an das entsprechende Epitop (Antigen), sichtbar gemacht werden. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen einer direkten und einer indirekten Methode.

Bei der direkten Methode ist der primäre Antikörper sozusagen direkt mit einem Enzym oder einem Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt. Dieser primäre Antikörper bindet dann an das Epitop. Bei der indirekten Methode ist der primäre Antikörper nicht "gelabelt". Dieser bindet an das zu untersuchende Epitop. Um dieses dann sichtbar zu machen, benötigt man einen sogenannten sekundären Antikörper, welcher Träger des fluoreszierenden Farbstoffs ist und gegen den primären Antikörper gerichtet ist. In der hier vorliegenden Forschungsarbeit wurde ausschließlich auf die indirekte Methode zurückgegriffen.

Da es immer wieder vorkommen kann, dass sich der primäre Antikörper an unspezifische Bindungsstellen bindet, müssen diese zuvor geblockt werden. Hierbei verwendet man ein so genanntes Blockingserum, welches ein Gemisch verschiedenster Antikörper, die jedoch nicht an das zu untersuchende Antigen binden, wohl aber an Epitope im zu untersuchenden Gewebe, ist. Um das Blockingserum herzustellen, greift man auf ein natives Serum, welches meist aus Pferd oder aus Ziege gewonnen wird, zurück und mischt dies in 0,1 M PBS mit einer

zusätzlichen Spatelspitze BSA (Bovine Serum Albumine). Dieses Blockingserum trägt man vor der Behandlung der Präparate mit den entsprechenden Antikörpern für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf. Da die primären Antikörper eine höhere Bindungsaffinität zu ihrem jeweiligen Epitop besitzen, verdrängen sie die Blockingmoleküle von den jeweiligen Bindungsstellen der primären Antikörper.

#### 3.6.1 anti-Glutaminsynthetase

##### **Glutaminsynthetase-Antikörperlösung**

###### Primärantikörper:

Anti-GluS (Glutaminsynthetase) in Maus (BD Transduction Laboratories TM, mouse anti-6/GS, Nr.610518) 1:200 verdünnt in Blocklösung

###### Sekundärantikörper:

Alexa Fluor® 488 (Exzitationsmaximum 495 nm; Emissionsmaximum 519 nm) Eesel-anti-Maus (Invitrogen A21202) 1:300 verdünnt in 0,05% Triton X-1000 in 0,1M PBS Pufferlösung + 1% BSA

Das Enzym Glutaminsynthetase katalysiert die Umsetzung von Ammoniak und Glutamat zu Glutamin (Wedler und Horn 1976). Im Vertebratengehirn ist es auf der Membranoberfläche von Gliazellen (Martinez-Hernandez et al., 1977; van der Hel et al., 2005), besonders in Astrozyten (Ward et al., 2004), zu finden. Im Gehirn von Invertebraten, so auch bei der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* (Boyan et al., 2011), ist das Enzym Glutaminsynthetase auf astrozytenähnlichen Gliazellen zu finden. Diese zeigen identische morphologische Merkmale wie durch Harzsch und Hansson, 2008 im Gehirn von Crustaceen gezeigt wurde. Der hier eingesetzte Glutaminsynthetase Antikörper erkennt ein Oktamer von identischen 45 kDa Untereinheiten.

Um die Antikörperfärbung durchzuführen, wurde der primäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 einer Blocklösung, welche mit einem Detergenz zur permeabilisierung der Membran versehen ist, auf die mit Schnitten versehenen Objektträger aufgetragen. Sobald der primäre Antikörper aufgetragen war, wurden die Objektträger in eine feuchte Kammer überführt und diese für 24 Stunden

Inkubationszeit in einem Kühlraum bei 4° C gelagert. Nach erfolgter Inkubationszeit und vor dem Auftragen des sekundären Antikörpers müssen die Präparate 6 Mal alle 10 Minuten in 0,1 M PBS gewaschen werden. Anschließend wird der sekundäre Antikörper (DAM-Alexa 488) in einer Verdünnung von 1:300 aufgetragen. Dies erfolgt wiederum in einer feuchten Kammer bei 4° C, allerdings beträgt die Inkubationszeit hier 24 Stunden.

#### 3.6.2 anti-HRP

##### **HRP-Antikörperlösung**

###### Primärantikörper:

Anti-HRP aus Kaninchen (Dianova 323-005-021) 1:150 verdünnt in Blocklösung

###### Sekundärantikörper:

Cy3 (Exzitationsmaximum 550 nm; Emissionsmaximum 570 nm) Ziege-anti-Kaninchen (Dianova 111-765-003) 1:150 verdünnt in 0,05% Triton X-1000 in 0,1M PBS

Pufferlösung + 1%BSA

Meerrettichperoxidase (Horsereddichperoxidase) ist ein Glykoprotein und gehört zur Gruppe der Zelloberflächenproteine, welche Adhäsions- und Signalmoleküle beinhalten (Snow et al., 1987). Diese Glykoproteine werden auf der gesamten Oberfläche von Neuronen und deren neuronalen Ausläufern exprimiert (Sun und Salvaterra 1995) und in Insekten Nervana (Nerve antigen) genannt. Die Größe des Enzyms beträgt 44,137.9-Dalton und beinhaltet 6 Lysinreste. In Insekten ist das Epitop neuronspezifisch (Jan und Jan 1982; Haase et al., 2001), wird jedoch nicht in Stammzellen wie neuronalen Vorläuferzellen, Neuroblasten oder Ganglionmutterzellen exprimiert (Salvaterra et al., 1987).

In dieser Arbeit wurde zum Sichtbarmachen der Neurone und deren Ausläufer auf den Antikörper HRP zurückgegriffen. Dieser wurde jedoch ausschließlich nach der Prozedur der Glutaminsynthetasebehandlung eingesetzt, wobei das Färbe- und Waschprotokoll entsprechend der Behandlung mit dem Antikörper für Glutaminsynthetase durchgeführt wurde.

### 3.6.3 anti-Repo

#### Repo-Antikörperlösung

##### Primärantikörper:

Anti-repo aus Kanninchen (Geschenk der Arbeitsgruppe Technau) 1:500 verdünnt in Blocklösung

##### Sekundärantikörper:

Cy3 (Exzitationsmaximum 550 nm; Emissionsmaximum 570 nm) Ziege-anti-Kaninchen (Dianova 111-765-003) 1:500 verdünnt in 0,05% Trinton X-1000 in 0,1 M PBS

Pufferlösung + 1% BSA

Die Expression des Proteins „reversed polarity“ (*repo*), welches durch ein Homöoboxgen generiert wird, beschränkt sich ausschließlich auf den Zellkern von Gliazellen (Mab 4a3; Halter et al., 1995; Geschenk G. Technau). Das Expressionsmuster dieses gliaspezifischen Proteins wurde hier durch den primären Antikörper anti-Repo dargestellt. Zum Sichtbarmachen des Proteins in Gehirnschnitten wurde der Antikörper 1:500 im Preinkubationsmedium verdünnt. Die Prozedur der Inkubationszeit und der anschließenden Waschschriffe gleicht wiederum der bei Glutaminsynthetase.

### 3.6.4 DAPI-Färbung

#### DAPI

4',6-Diamidin-2-phenylindol (Sigma 32670) 1:100 verdünnt in 0,1M PBS

In der Immunhistochemie wird DAPI (Diamidin-2-phenylindol) allgemein zum Sichtbarmachen von DNA im Zellkern benutzt. DAPI ist ein zellpermeabler fluoreszenter Farbstoff mit der Affinität, an A-T-reiche Regionen der kleinen Furche des DNA-Doppelstranges zu binden (Naimski et al., 1980). Nach der Bindung an diese Region kommt es zu einer Umlagerung der Wassermoleküle im Farbstoff. Durch besagte Umlagerung dieser Wassermoleküle wird die Fluoreszenz des DAPI-Farbstoffes um das 20fache erhöht. Betrachtet man die DAPI-Färbung unter einem



Fluoreszenzmikroskop ist eine bläuliche Färbung zu erkennen, da das Absorptionsmaximum bei 358 nm, das Emissionsmaximum bei 461 nm liegt (Wilson et al., 1990). Die DAPI-Färbung wurde herangezogen um einzelne Zellen zu erkennen, und auch durch die durchgeführten Doppel- bzw., Dreifachfärbungen zu identifizieren. Um die DAPI-Färbung durchzuführen wurde der Farbstoff 1:100 in PBS verdünnt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 30minütiger Inkubationszeit wurden die behandelten Hirnschnitte umgehend 6 Mal alle 10 Minuten in 0,1 M PBS gewaschen.

### **3.7 Tracerexperimente**

Es wurden mit der Methode der Dye-Injection zwei unterschiedliche Untersuchungen durchgeführt. Zum einen wurden Untersuchungen über Zellkopplung der Gliazellen um den Zentralkörper untersucht, zum anderen wurde die Morphologie einzelner Gliazellen um den Zentralkomplex untersucht. Beides beruht auf derselben Methode, der Unterschied besteht hier lediglich in der Schneidetechnik und der Dicke des Gewebes, welches der anschließenden Prozedur der Dye-Injektion vorausgeht.

Bei der Untersuchung der Zellkopplung wurden ausschließlich unfixierte Präparate benutzt, die am Cryostat mit einer Dicke von 18 µm geschnitten wurden, und nach erfolgter Dye-Injektion mit Bouin fixiert wurden.

Bei der Untersuchung der Morphologie einzelner Gliazellen wurden die besten Ergebnisse an 50 µm dicken Präparaten erzielt, welche mit PFA vorfixiert wurden (1 h bei RT). Sobald die gewünschte zu untersuchende Region (Zentralkörper) im Gehirn beim Vorgang des Schneidens erreicht wurde, wurden die einzelnen Schnitte, sowohl beim Schneiden am Cryostat, als auch beim Schneiden am Vibratom, einzeln auf einen Objektträger überführt, mit Pap-Pen umrundet und mit 0,1 M PBS überschichtet.

Die dye-Injections Experimente wurden alle unter einem Zeiss Axioskop 2 Mikroskop durchgeführt. Um die Schnitte unter dem Mikroskop zu finden wurde eine 10fache Vergrößerung gewählt. Die Experimente an sich wurden dann unter einem mit Keramik beschichteten Wasserobjektiv mit 63facher Vergrößerung durchgeführt. Ein mit Silberchlorid beschichteter Draht ist während der Experimente stets als

Referenzelektrode in der Pufferlösung zu belassen. Der Objektträger mit dem gefrorenen Gehirnschnitt wurde auf ein Fixed-Stage-Mikroskop (Zeiss Axioskop 2), welches mit Epifluoreszenz und Differential Interface Contrast optics (DIC) ausgestattet ist, transferiert. Der Schnitt war mit einer physiologischen Kochsalzlösung (150 mM NaCl, 3 mM KCL, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM TES Puffer, pH 7.0) bei Raumtemperatur bedeckt. Die DIC Bilder und die intrazelluläre Mikroinjektion bestätigen, dass es zu keinem Zeitpunkt der Prozedur zu einer Beschädigung des Zellmaterials kam (siehe Ergebnisse). Um die intrazelluläre Penetration in die gewählte Zelle und das Lösen der Mikroelektrode nach der Injektion des Farbstoffes zu erleichtern, wurde die Mikroelektrode zuvor in fetal calf serum, welches als Gleitmittel dient, getaucht. Die Intrazellulären Injektionen wurden optisch mit einem Zeiss Keramik Achromat Wasserimmersionsobjektiv (63x Vergrößerung), welches an ein Zeiss Axioskop 2 Mikroskop mit einer 1.3 MP CCD Farbkamera (Scion Corp.) angebracht ist, und mit Scion Visicapture™ beobachtet. Die Mikroinjektionen wurden einzig im Zellkörper vorgenommen um möglichen Schaden und um unbeabsichtigt Färbungen benachbarter Zellen und deren Projektionen zu verhindern. Der Elektrodenhalter wurde mit einem Getting 5 DC Verstärker verbunden, der einen Stromfluss via einer virtuellen Masse gewährleistet. Die Zellen wurden iontophores gefärbt. Dies wurde durch einen konstanten hyperpolarisierenden Stromfluss, der 5 nA nicht überschritt gewährleistet. Um den Färbeprozess zu Dokumentieren verblieb die Elektrode während der Mikroinjektion in situ. Die verschiedenen modularen Neuropile des Zentralkomplexes und die mit dessen assoziierten Gliazellen wurden in den Gehirnschnitten, basierend auf ihrer Lokalität und ihrem Erscheinen, optisch identifiziert. Die Gliaidentität wurde anschließend durch immunhistochemische Färbungen bestätigt. Die immunhistochemischen Färbungen wurden auf dem selben Superfrost® Plus Objektträger (Menzel-Gläser), mit den darauf enthaltenen durch Mikroinjektion gefärbten Zellen durchgeführt. Zum Einstechen in die gewählten Zellen wurde eine 0,1 µm dicke Glaskappillarmikroelektrode (GC100TF-10) mit einem maximalen Widerstand 30 40 MΩ (mit enthaltenem Tracerfarbstoff) gewählt. Sowohl bei den Zellkopplungsexperimenten, wie auch bei den Experimenten zur Morphologie der Zellen wurde mit dem fluoreszenten Farbstoff Alexa Fluor® 568 (Exzitationsmaximum 573 nm; Emissionsmaximum 600 nm) gearbeitet. Um die Mikroelektroden mit dem besagten Farbstoff zu befüllen, wurden diese in ein mit dem Farbstoff gefülltes

Eppendorf-Röhrchen gestellt. Durch die herrschenden Kapillarkräfte steigt der Farbstoff in der Mikroelektrode bis zur Spitze auf. Sobald die Mikroelektrode befüllt ist, überführt man sie in eine Halterung, die mit 200 mM KCL gefüllt ist. Diese Halterung wurde dann auf einen Mikromanipulator, welcher am Mikroskop angebracht ist, befestigt. Dieser dient zum Heranführen der Mikroelektrode an die Zielzelle. Sobald die Mikroelektrode in das Soma der Zielzelle eingestochen wurde, wurde über einen Verstärker ein hyperpolarisierender Strom von 3–4 nA angelegt, und somit der Farbstoff aus der Mikroelektrode aktiv in die Zelle gepumpt. Um die einzelnen Schritte zu dokumentieren wurden während der Versuche über eine 1,3 MP Color CCD Kamera (Scion Corporation) und der Scion Visicapture<sup>TM</sup> Software Bilder aufgenommen.

### 3.8 Gap-junctional blocker

Alex Fluor<sup>®</sup> 568 hat ein kleines Molekulargewicht (siehe Weber et al., 2004). Somit kann der Durchfluss von Zelle zu Zelle möglicherweise durch gap junctions vermittelt werden. Diese Annahme wurde durch Zugabe von  $1 \times 10^{-5}$  M *n*-Heptanol (ein nachgewiesener gap-junctional Blocker, siehe Weingart und Bukauskas 1998; Juszczak und Swiergiel 2009; Boyan et al., 2011) in den TES Puffer, welcher den Hirnschnitt bedeckt, vor den Mikroinjektionsexperimenten, getestet. Die Konzentration von *n*-Heptanol wurde von vorangegangenen ähnlichen Experimenten, welche sich mit Kommunikation via gap junctions im embryonalen Heuschreckengehirn (Boyan et al., 2011) und in intakten unfixierten *Hydra* (Chapman et al., 2010) befassten, übernommen. Das Vorhandensein der gefärbten Zelle in allen Wiederholungen der Experimente beweist, dass die Injektion des Farbstoffes selbst, durch Zugabe von *n*-Heptanol nicht beeinträchtigt wurde.

### 3.9 Eindeckeln der Präparate

Sobald die Präparate die Prozedur des Färbens und des anschließenden Waschens durchlaufen haben, werden sie mit Vectashield<sup>®</sup> Mounting Media (Vector Laboratories) beschichtet. Da Vectashield<sup>®</sup> Bestandteile des Glycerols enthält, dient es hier als Konservierungsstoff und gleichzeitig schützt es die Fluoreszenzfarbstoffe vor dem Ausbleichen.

### 3.10 Mikroskopie

Zum Überprüfen der Färbungen und zur Auswahl der Präparate, die anschließend an einem Konfokalmikroskop aufgenommen werden, wurde ein Leica DM5000 B Fluoreszenzmikroskop mit einer 1,3 MP Color CCD Kamera (Scion Corporation) benutzt. Am Zeiss Axioskop 2 Fluoreszenz Mikroskop wurde der injizierte Farbstoff Alexa Fluor® 568 ebenso durch violette Wellenlängen (430-440 nm) angeregt und bei einer gelblich/orangen Emission der Wellenlänge 535 nm aufgenommen. Dies erlaubt im Nachhinein eine bessere Definition der gefärbten Zellen und einen wesentlich geminderten Background, sobald der Gehirnschnitt gleichzeitig mit Durchlicht beleuchtet wurde. Mit Ausnahme der Bilder, welche die einzelnen Schritte der Tracerexperimente dokumentieren, wurden alle Abbildungen an einem Leica TCS SP2 Konfokalmikroskop, ausgestattet mit X20 und X63 Ölimmersionsobjektiven angefertigt. Dabei wurde stets darauf geachtet, die Scanebenen konstant auf 0,5 µm einzustellen. Der Argonlaser des Konfokalmikroskops wurde zur Aufnahme der Bilder auf die Wellenlängen 405 nm für DAPI, 488 nm für Alexa 488 und 561 nm für Cy3 und Alexa Fluor® 568 eingestellt.

### 3.11 Bildbearbeitung

Die am Konfokalmikroskop gemachten einzelnen Scans (Stacks) des jeweiligen Präparates wurden mit ImageJ (Public Domain) zu einem Einzelbild (Z-Projektion) zusammengeführt und mit dem Programm Canvas X™ Software bearbeitet. Die bildliche Dokumentation der Tracerexperimente wurde mit der Scion Visicapture™ Software aufgenommen.

### 3.12 Achsen und Begriffe

Die Definition der neuronalen Achsen bezieht sich auf Boyan et al., 2010. Dabei wird die Neuroarchitektur des Gehirns der Heuschrecke nicht nach den Körperachsen, sondern nach den Neurachsen definiert. Somit ist die Oberseite des Gehirns als neuronal anterior und die Unterseite des Gehirns als neuronal posterior; die Vorderseite des Gehirns als neuronal ventral und die Rückseite des Gehirns als neuronal dorsal definiert.

### 3.13 Pufferlösungen

#### **PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung)**

##### Lösung A (0,2 M)

27,6 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  Monohydrat in 1 l dest.  $\text{H}_2\text{O}$

##### Lösung B (0,2 M)

56,8 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anhydr. und 43,2 g  $\text{NaCl}$  in 2 l dest.  $\text{H}_2\text{O}$

##### Für 0,1M PBS Lösung:

80 ml Lösung A

420 ml Lösung B

500 ml dest.  $\text{H}_2\text{O}$

Anschließend pH-Wert mit Lösung A bzw. Lösung B auf 7,4 einstellen (Kontrolle mit pH-Meter)

#### **200mM KCL-Lösung**

Für 100ml 200mM Kaliumchlorid-Lösung werden 1,4912g KCL (Kaliumchlorid) Pulver in destilliertem Wasser gelöst.

#### **TES Puffer**

TES 1,146 g/l □ 5 mM

$\text{NaCl}$  8,766 g/l □ 150 mM

$\text{KCl}$  0,224 g/l □ 3 mM

$\text{CaCl}_2$  0,294 g/l □ 2 mM

$\text{MgSO}_4$  2,465 mM □ 1 mM

Anschließend pH-Wert mit  $\text{NaOH}$  auf pH 7,0 einstellen

#### **0,05% PBS-Triton X-1000**

50 $\mu\text{l}$  Triton X-1000 gelöst in 100 ml 0,1M PBS

0,1% PBS-Triton X-1000

100 $\mu\text{l}$  Triton X-1000 gelöst in 100 ml 0,1M PBS

**Blocklösung (für HRP/ GluS)**

0,5% Triton X-1000

1%NHS (Native Horse Serum)

0,1%BSA (Bovin Serum Albumin)

gelöst in 0,1M PBS Pufferlösung

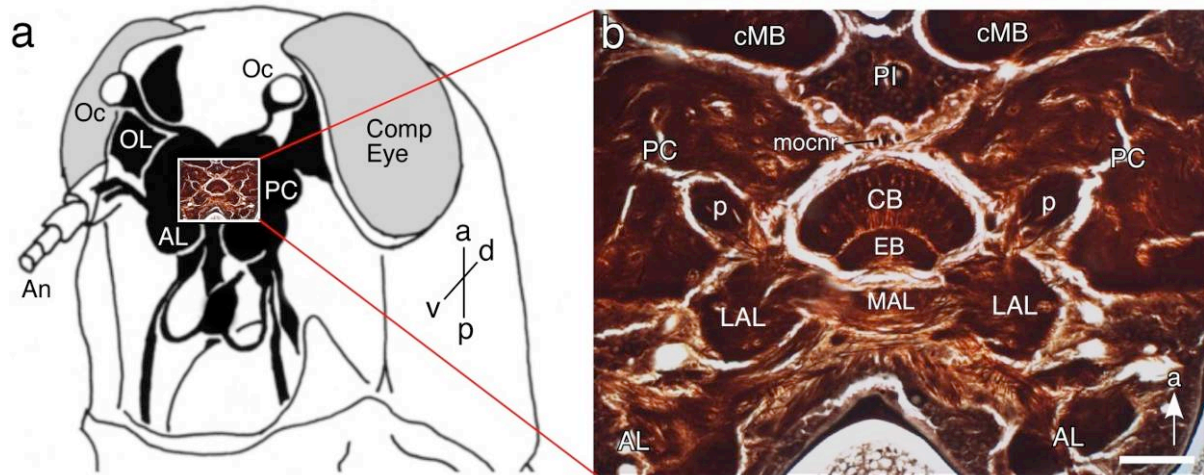
## 4 Ergebnisse

Im folgenden Ergebnisteil wird die embryonale Entwicklung des Zentralkomplexes, speziell des Zentralkörpers der Wüstenheuschrecke *Schistocerca gregaria* und die mit ihm assoziierten Gliazellen beschrieben. Diese Gliazellen werden als solche anhand immunhistochemischer Färbungen identifiziert. Im weiteren Verlauf wird auf die embryonale Entwicklung und die Verbreitung der Gliazellen im Einzelnen eingegangen. Diese befinden sich zunächst unter kommissuralen Fasern in der Median Domäne. Im Verlauf der Embryonalentwicklung migrieren sie zum Entstehungsort des Zentralkörpers und beginnen den Zentralkörper von anderen Neuropilen im Protocerebrum abzugrenzen.

Abschließend wird auf die Entwicklung glialer Projektionen und die damit einhergehende Fragestellung, ob diese ein Netzwerk via gap junctions bilden, eingegangen.

### 4.1 Module des Zentralkomplexes des Mittelgehirns

Betrachtet man den Zentralkomplex der Orthoptera, erkennt man, dass dieser aus fünf modularen Neuropilen besteht, welche an der Mittellinie zwischen den protocerebralen Hemisphären liegen (Abbildung 4.1a, b): die protocerebrale Brücke (PB), der Zentralkörper (CB) (auch als obere Einheit des Zentralkomplexes benannt in Heinze und Homberg 2008), der Ellipsoidkörper (EK) (auch als untere Einheit des Zentralkomplexes benannt in Heinze und Homberg 2008), die paarweise angeordneten Noduli und die accessorischen Loben (lateral (LAL) und median (MAL) (Williams 1975; Müller et al., 1997; el Jundi et al., 2010). Der Zentralkörper ist durch seine stereotypische säulenartige Neuroarchitektur charakterisiert. Die Projektionen der Axone deren Ursprung an Zellen in der Pars intercerebralis liegt, ziehen zuerst über die protocerebrale Brücke über die w ,x ,y ,z Trakte in den Zentralkörper (Abbildung 4.1 b).



**Abbildung 4.1: Module des Zentralkomplexes im Protocerebrum einer ausgewachsenen Heuschrecke.**

Quelle: Boyan, Loser, Williams, Liu (2011). Dev. Genes Evol. 221, 141-155

### Erklärung zu Abbildung 4.1:

**a** Schematische Ansicht des Kopfes mit Gehirn (schwarz) zeigt den Ort des Zentralkomplexes im Protocerebrum (eingefügt). Modifiziert von Williams et al. (2005) mit Genehmigung von Elsevier. **b** Frontalschnitt des Gehirns nach einer Bielschowsky Färbung mit Zentralkörper, Ellipsoidkörper, lateraler azzessorischer Loben und medianer azzessorischer Loben im Mittelhirn in vergrößerter Ansicht. Die protocerebrale Brücke und Noduli (siehe Abbildung 4.6) sind in dieser Schnittebene nicht vorhanden. Die enthaltenen Achsen entsprechen den neuronalen Achsen. Maßstab in (b) entspricht 160 µm.

### Abkürzungen in Abbildung 4.1

AN Antenne. AL Antennenloben. CB Zentralkörper. cMB Calyx der Pilzkörper. Comp Eye Komplexauge. EB Ellipsoidkörper. LAL Lateral azzessorischer Loben. MAL Median azzessorischer Loben. mocnr medianer ocellarer Wurzelnerv. Oc Ocellus. OL optische Loben. p Pedunculus des Pilzkörpers. PC Protocerebrum. PI Pars intercerebralis. a anterior.

### 4.1.1 Die Entwicklung der Neuropile des Mittelgehirns und deren Abgrenzung durch Gliazellen

Die strukturelle Entwicklung des Zentralkomplexes der hemimetabolen Heuschrecke *Schistocerca gregaria* ist im Laufe der Embryonalentwicklung, im Gegensatz zur biochemischen Entwicklung, komplett abgeschlossen. So werden manche Botenstoffe erst postembryonal exprimiert (siehe Herbert et al., 2010). Diese Entwicklung des Zentralkörpers ist in der zweiten Hälfte der embryonalen Entwicklung sichtbar (Abbildung 4.2a). Im Laufe der Entwicklung, während der mittleren Phase der Embryogenese, zeigt sich durch das Markieren mit dem axonspezifischen Marker anti-8B7, dass Fasern, welche zur anterioren, bzw.

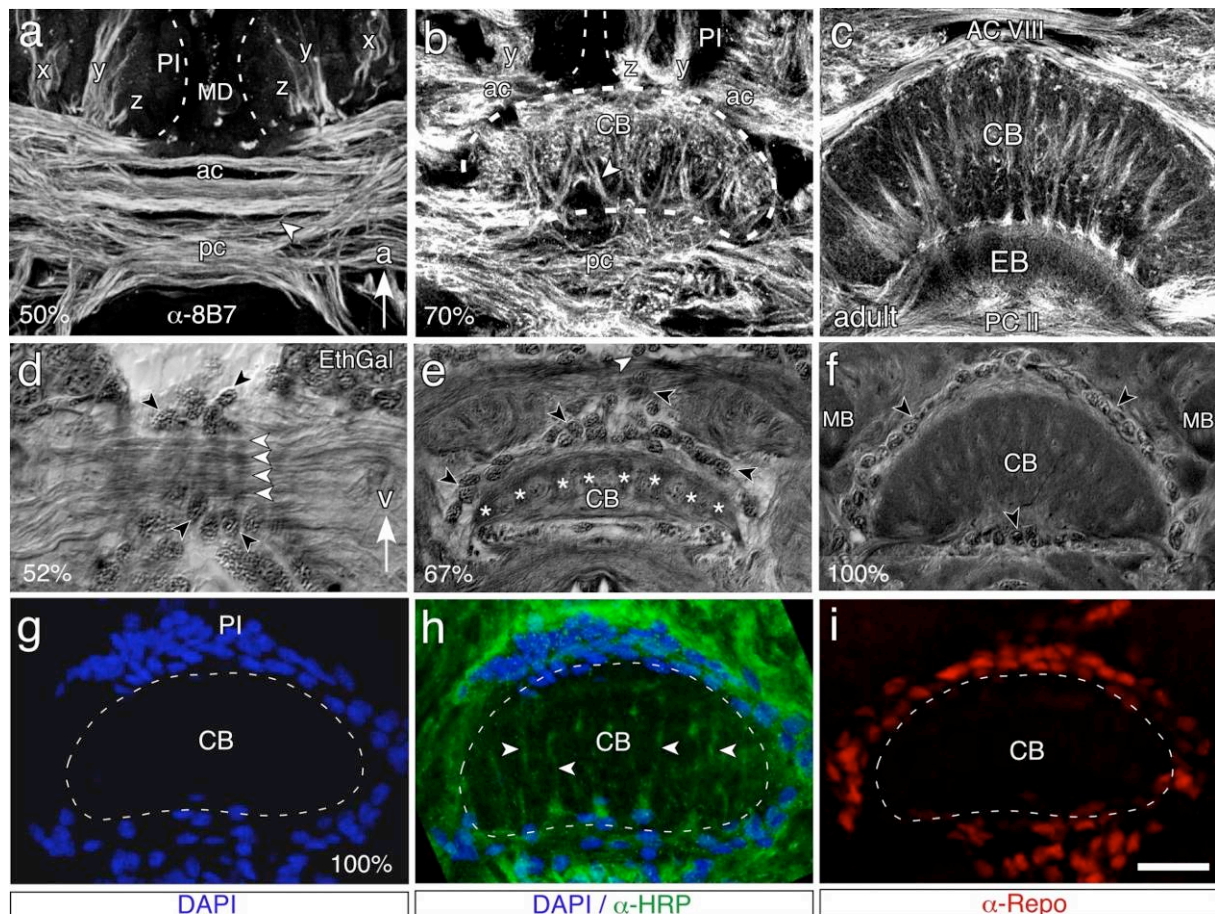


posterioren Kommissur gehören, ihre Prozesse über die Mittellinie senden. Bis zu diesem Zeitpunkt hat sich noch kein Neuropil des Zentralkomplexes geformt, aber die Kreuzung individueller Faszikel beginnt bereits. Bei einem embryonalen Entwicklungsstand von 70% (Abbildung 4.2b) hat sich die säulenartige Neuroarchitektur des Zentralkomplexes zwischen den anterioren (ac) und den posterioren (pc) Kommissuren gebildet und seine Architektur ähnelt bereits dem adulten Tier (Abbildung 4.2c).

Die Organisation der vermeintlichen Gliazellen, welche mit dem Zentralkörper in Zusammenhang stehen, wurden zuerst in Gehirnschnitten mit der Osmium-Ethyl-Gallate-Methode untersucht. Bei 52%iger Embryogenese (Abbildung 4.2d) kreuzen nur Faszikel der Kommissuren die Mittellinie. Zusammenhängend mit den Kommissuren, dieses Entwicklungsstands, ist eine bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht identifizierte Population an Zellkörpern zu erkennen, welche sich dorsoventral über das komplette Mittelhirn ausbreiten. Wie zuvor berichtet (siehe Abbildung 4.2a), muss sich nun der Zentralkomplex formen und die Neuropile des Mittelhirns, ähnlich des zentralen Bauchmarks, gestalten (siehe Boyan et al., 2008a). Bei 67%iger Embryogenese (Abbildung 4.2e), anschließend an die Entwicklungsphase, welche als fascicle switching bekannt ist (Boyan et al., 2008), ist der Zentralkörper (CB) mit seiner säulenartigen Neuroarchitektur klar erkennbar. Das Muster der erwähnten nicht identifizierten Zellkörper, welche zu einem früheren Zeitpunkt schon erkennbar sind, hat sich ebenfalls geändert. Diese Zellkörper umhüllen nun den Zentralkörper. Demnach grenzen diese Zellen nun diese Einheit von dem umgebenden diffusen Neuropil ab, formen aber eine kontinuierliche Population mit den Zellen in der Pars intercerebralis. Am Ende der Embryogenese (100%; Abbildung 4.2f) ist das Neuropil des Zentralkörpers mit seiner säulenartigen Neuroarchitektur vollständig von den erwähnten Zellkörpern umhüllt. Im Verlauf der Forschung konnten zu keinem Zeitpunkt Zellkörper, die mit der Entstehung des Säulensystems in Verbindungen stehen, identifiziert werden.

Die Art und Beschaffenheit der Zellen, die den Zentralkomplex, speziell den Zentralkörper, in seine Kompartimente unterteilen, wurde in der hier vorliegenden Arbeit immunhistochemisch untersucht. Die dazu benötigten Methoden zur Untersuchung der genannten Zellen wurde im Laufe dieser Arbeit etabliert. Die Zellkörper, die sich bereits histologisch erkennen lassen (Abbildung 4.2f), lassen sich

durch eine Fluoreszenzfärbung mittels DAPI und einer anti-HRP Färbung spezifizieren (Abbildung 4.2g, h). Konfokale Aufnahmen horizontaler Hirnschnitte bei 100%iger Embryogenese nach erfolgter DAPI Färbung zeigen, dass ebensolche Zellkerne den Zentralkörper umhüllen. Doppelfärbungen (DAPI/anti-HRP; Abbildung 4.2 h) indizieren nun, dass diese Zellkerne zu den HRP-negativen Zellen gehören, was einen ersten Hinweis darauf gibt, dass sie Gliazellen verkörpern könnten. Schließlich konnte durch die gliaspezifische anti-Repo Färbung (Abbildung 4.2i) gezeigt werden, dass es sich um eine Schicht von Gliazellen handelt, welche das Neuropil des Zentralkörpers in gleicher Weise umhüllen, wie zuvor durch die DAPI Färbung gezeigt wurde (siehe Abbildung 4.2h). Daher sind Gliazellen an der Kompartimentalisierung dieses Moduls des Mittelhirns miteinbezogen.



**Abbildung 4.2: Entwicklung des Neuropils des Zentralkörpers und dessen Kompartimentalisierung durch Gliazellen des Mittelhirns.**

Quelle: Boyan, Losser, Williams, Liu (2011). Dev. Genes Evol. 221, 141-155

### Erklärung zu Abbildung 4.2

a – c Konfokale Aufnahmen der Mittelhirnregion nach einer 8B7 Färbung zeigt die Entwicklung des Zentralkörpers und dessen Neuroarchitektur. Pfeil zeigt nach anterior (a). a 50%iger

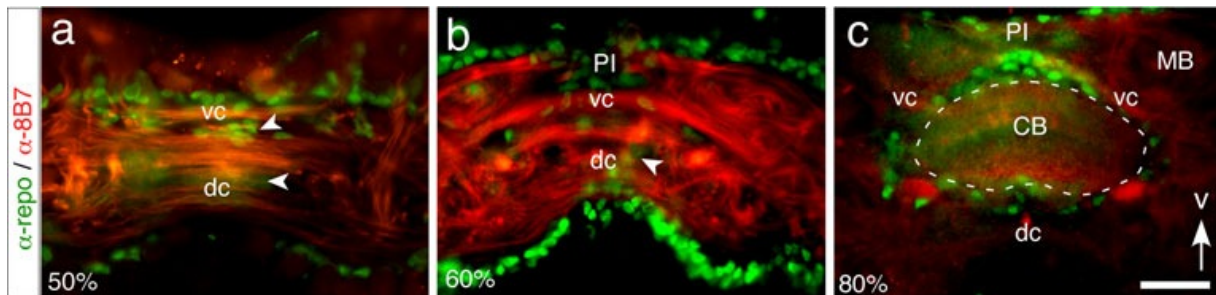
Entwicklungsstand des Gehirns: Faserkommissuren die zum anterioren und posterioren System der Kommissuren gehören, projizieren durch das Mittelhirn. Das Neuropil des Zentralkomplexes hat sich noch nicht gebildet, jedoch hat die Initiierungsphase, die das fascicle switching (weiße Pfeilspitzen) zur Folge hat, bereits begonnen. **b** Zum Zeitpunkt 70%iger Embryogenese: die kolumnäre Neuroarchitektur (weiße Pfeilspitzen) des Zentralkörpers (--- Grenze des Zentralkörpers) hat sich zwischen der anterioren und posterioren Kommissur gebildet. Projektionen aus der Pars intercerebralis zum Zentralkörper über die z und y Faserbündel sind zu sehen. **c** Adultes Gehirn: die kolumnäre Neuroarchitektur des Zentralkörpers, die anteriore und posteriore Faserkommissuren verknüpft, tritt hervor. **d-f** Mikroskopische Aufnahmen (DIC) horizontaler Schnitte des Mittelhirns nach erfolgter osmium ethyl gallate Färbung. Die drei verschiedenen Embryonalstadien der Schnitte zeigen die Organisation der vermeintlichen Gliazellen und deren Zusammenhang mit dem Zentralkörper. Pfeil zeigt in Abbildungen **d-i** nach ventral (v). **d** Bei 52%iger Embryogenese: Parallele Kommissuren (weiße Pfeilspitzen) überqueren die Mittellinie des Gehirns. Posterior (schwarze Pfeilspitzen) liegen zahlreiche Zellsomata. Der Zentralkomplex hat sich zu diesem Zeitpunkt noch nicht geformt. **e** Bei 67%igem Entwicklungsstand: Der Zentralkörper sowie seine typische säulenartige Neuroarchitektur (weiße Sterne) beginnt sich zu formen. Die Zellsomata (schwarze Pfeilspitzen) umhüllen den Zentralkörper, grenzen diesen gegen das diffuse Neuropil ab, und bilden eine bestehende Population an Gliazellen mit den Zellen aus der Pars intercerebralis (weiße Pfeilspitzen). **f** Bei 100%iger Embryogenese: das Neuropil des Zentralkörpers ist nun komplett mit Zellsomata (schwarze Pfeilspitzen) eingehüllt. Im Zentralkörper selbst sind keine Zellkörper zu finden. **g** Konfokale Aufnahme eines Horizontalschnittes bei 100%iger Embryogenese nach erfolgter DAPI Färbung. Der Zentralkörper ist deutlich von Zellkernen, die ein abgetrenntes Kompartiment des Hirns bilden, umhüllt. **h** Konfokale Aufnahme eines Horizontalschnittes bei 100%iger Embryogenese nach erfolgter Doppelfärbung (DAPI/anti-HRP). Die Zellkörper, die den Zentralkörper umhüllen, sind HRP-negativ. Die säulenartige Neuroarchitektur des Zentralkörpers ist zu erkennen (weiße Pfeilspitzen). **i** Die konfokale Aufnahme eines Horizontalschnittes bei 100%iger Embryogenese nach erfolgter gliaspezifischer anti-Repo Färbung zeigt Gliazellen, die den Zentralkörper umhüllen und diesen räumlich im Mittelhirn abgrenzen. Maßstab in **i** repräsentiert 30 µm in **a**, 35 µm in **b**, 60 µm in **c**, 30 µm in **d**, 40 µm in **e**, 45 µm in **f**, und 40 µm in **g-i**

### Abkürzungen in Abbildung 4.2:

ac anteriore Kommissur. AC VIII anteriore Kommissur. CB Zentralkörper. EthGal osmium ethyl gallate Färbung. MB Pilzkörper. MD mediane Domäne. pc posteriore Kommissur. PCII posteriore Kommissur. PI Pars intercerebralis. --- Grenze des Zentralkörpers.

### 4.1.2 Die Umverteilung der Gliazellen des Mittelhirns im Verlauf der Embryogenese

Der Zentralkomplex entwickelt sich während der letzten Hälfte der Embryogenese. Vorausgehend (<50%) wurden Repo-positive Gliazellen des Mesencephalons zwischen 8B7-positiven Faserkommissuren gefunden (Abbildung 4.3a). Anschließend (60%) verteilen sich die Gliazellen des Mittelhirns neu und werden mit der frühen säulenartigen Neuroarchitektur des sich entwickelnden Zentralkörpers assoziiert (Abbildung 4.3b). Während sich der Zentralkörper entwickelt (80%), umrunden nun die Zellkörper der Gliazellen dieses Neuropil und grenzen es demnach von den anderen Strukturen des Gehirns ab (Abbildung 4.3c). Dieses Verteilungsmuster der Gliazellen bleibt während der späteren Entwicklung erhalten (siehe Abbildung 4.16). Astrozytenähnliche Gliazellen, jedoch keine Neurone, umrunden das Neuropil des Zentralkörpers.



**Abbildung 4.3: Umverteilung der Gliazellen im Mittelhirn im Verlauf der Embryogenese.**

Quelle: Boyan, Liu, Loser (2012). Dev. Genes Evol. 222, 125-138

#### Erklärung zu Abbildung 4.3:

Photomikrographische Aufnahmen von Gehirnschnitten bei drei unterschiedlichen Entwicklungsstadien (50, 60 und 80%) nach erfolgter Doppelfärbung. Färbung für Gliazellen (anti-Repo, grün), Färbung für Axone (anti-8B7, rot) **a** Vor der Bildung des Zentralkomplexes (50%) sind Gliazellen im Mittelhirn zwischen den Fasern der Kommissuren verteilt zu finden (weiße Pfeilspitzen). **b** Bei 60%igem Entwicklungsstand beginnen die Gliazellen sich mit dem entstehenden Zentralkomplex und dessen säulenartiger Neuroarchitektur zu assoziieren (weiße Pfeilspitzen). **c** Während sich der Zentralkörper bildet (80%) umrunden die Gliazellen das entstehende Neuropil und grenzen es von anderen entstehenden Gehirnstrukturen ab. Pfeil in **c** zeigt nach ventral und ist für alle Teilabbildungen gültig. Maßstab in **c** repräsentiert in allen Teilabbildungen 60 µm.

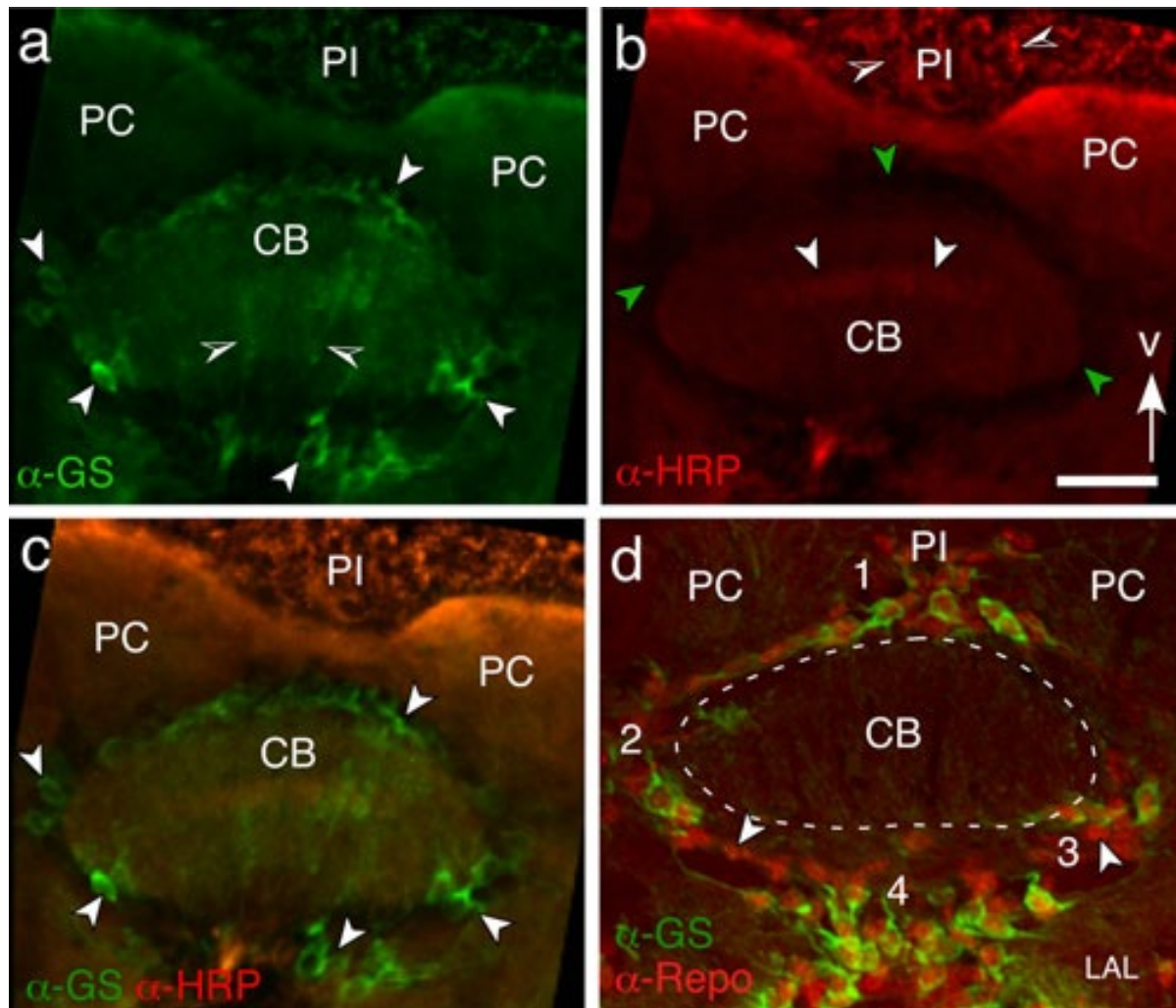
#### Abkürzungen in Abbildung 4.3:

ac anteriore Kommissur. CB Zentralkörper. MB Neuropil der Pilzkörper. PI Pars intercerebralis. vc ventrale Kommissur. --- Grenze des Zentralkörpers.

### **4.1.3 Astrozytenähnliche Gliazellen, jedoch keine Neurone umrunden das Neuropil des Zentralkörpers**

Die Doppelfärbung zeigt GS-positive/HRP-negative Zellen (Abbildung 4.4a, b), die das embryonale Neuropil sowie den Zentralkörper umrunden. Zudem sind all die GS-positiven Zellen auch Repo-positiv (Abbildung 4.4d). Basierend auf diesem Expressionsmuster können diese Zellen als astrozytenähnliche Gliazellen kategorisiert werden (Boyan et al., 2011). Im Gegensatz findet man HRP-positive neuronale Somata in kortikalen Regionen wie z.B. in der Pars intercerebralis. Deren Axone projizieren in den Zentralkörper, es sind jedoch keine neuronalen Somata in der Region die den Zentralkörper umrunden auszumachen (Abbildung 4.4b). Da nur sehr wenige Repo-positive/GS-negative Zellen zu finden sind (Abbildung 4.4d), kann man daraus schließen, dass die große Mehrzahl der Gliazellen, welche den Zentralkörper umrunden, und gleichzeitig Zellkopplungsversuche durchgeführt wurden, GS-positive/Astrozytenähnliche Gliazellen sind. Als zusätzliche Kontrolle wurde die Identität der Gliazellen unabhängig von den Zellkopplungsexperimenten nach jedem Experiment bekräftigt (siehe unten).





**Abbildung 4.4:** Gliazellen, die am Ende der Embryogenese (100%) das Neuropil des Zentralkomplexes umrunden sind vorherrschend astrozytenähnlich.


Quelle: Boyan, Liu, Loser (2012). Dev. Genes Evol. 222, 125-138

#### Erklärung zu Abbildung 4.4:

**a-c** Konfokale Aufnahmen eines Hirnschnittes nach erfolgreicher Doppelfärbung (anti-GS, grün; anti-HRP, rot). In **a** und **b** sind jeweils die einzelnen Farbkanäle abgebildet. **a** Nur den Grünkanal betreffend. Die Färbung zeigt GS-positive astrozytenähnliche Gliazellen (weiße Pfeilspitzen), die den Zentralkörper umrunden und ausgedehnte Projektionen (schwarz-weiße Pfeilspitzen) in das Neuropil des Zentralkörpers senden. Man beachte, dass in der Pars intercerebralis kaum GS-positive Zellen zu finden sind. **b** Nur den Rotkanal betreffend. Anti-HRP Färbung zeigt eine Dichte HRP-positiver Neuriten (weiße Pfeilspitzen) innerhalb des Zentralkörpers, als auch eine Vielzahl HRP-positiver Zellkörper (schwarz-weiße Pfeilspitzen) in der Pars intercerebralis. Man beachte, dass in der Zone direkt um den Zentralkörper keine HRP-positive Färbung zu beobachten ist (grüne Pfeilspitzen). **c** Zusammengesetzte Kanäle (rot/grün) zeigen Zellen, die den Zentralkörper umrunden. Diese Zellen sind GS-positiv/HRP-negativ und daher astrozytenähnliche Gliazellen. **d** Konfokale Aufnahme eines Hirnschnittes nach erfolgreicher Doppelfärbung (anti-Repo, rot; anti-GS, grün) zeigt, dass alle GS-positiven astrozytenähnliche Gliazellen (grün) auch anti-Repo (rot) co-exprimieren. Andere nichtidentifizierte Gliazelltypen (weiße Pfeilspitzen) sind Repo-positiv/GS-negativ. Die Zahlen

repräsentieren die Stellen an denen intrazelluläre Injektionen mit Alexa Fluor® 568 vorgenommen wurden, um Zellkopplungen innerhalb der Gliapopulationen zu testen (siehe Abbildung 4.10). Pfeil in **b** zeigt nach ventral und ist für jede Teilabbildung gültig. Maßstab in **b** repräsentiert 38 µm in **a-c**, 33 µm in **d**

### Abkürzungen in Abbildung 4.4:

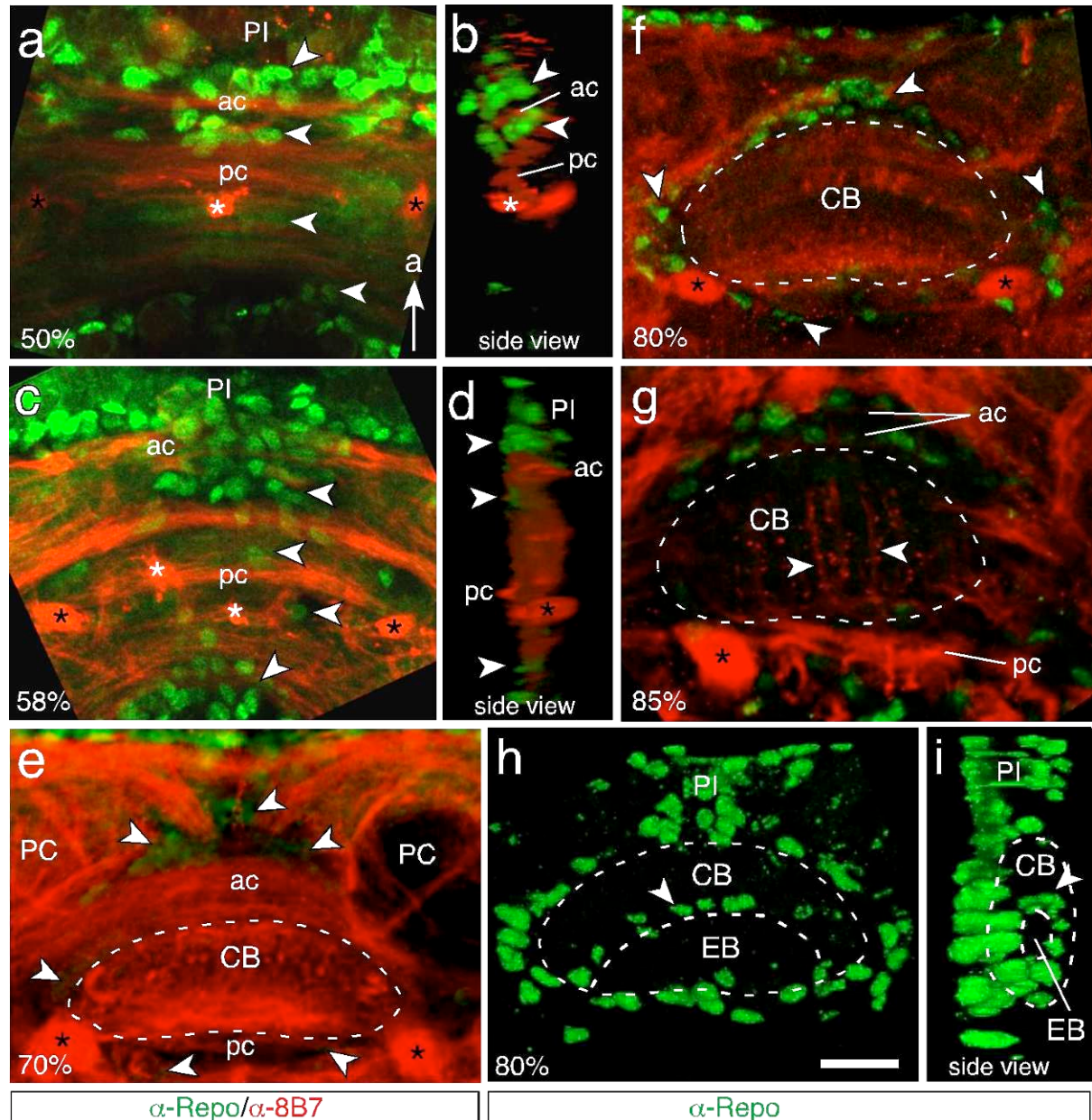
CB Zentralkörper. LAL laterale azzessorische Loben. PC Protocerebrum. PI Pars intercerebralis. Die Zahlen 1-4 in 4.4d repräsentieren die Stellen, an denen intrazelluläre Injektionen mit Alexa Fluor® 568 vorgenommen wurden (siehe Abbildung 4.10).  Grenze des Zentralkörpers.

### 4.1.4 Verbreitung und Entwicklung der Gliazellen des Mittelhirnneuropils

Wie in Abbildung 4.2g-i klar zu erkennen ist, wird der Zentralkörper bei einem embryonalen Entwicklungsstand von 100% durch einen Ring aus Zellen deutlich eingegrenzt. Um diese Zellen zu identifizieren wurde zunächst eine DAPI/anti-HRP Färbung durchgeführt (siehe Abbildung 4.2h). Das Ergebnis dieser Färbung lässt den Schluss zu, dass es sich um Gliazellen handeln könnte, da diese Zellen keinen neuronalen Charakter aufweisen.

Um die Beziehung des Musters der Gliazellen zum sich entwickelnden Neuropil des Mittelhirns aufzuzeigen wurden Doppelfärbungen mit dem gliaspezifischen Marker Repo und dem axonspezifischen Marker 8B7 durchgeführt (Abbildung 4.5). Bei 50%iger Embryogenese (Abbildung 4.5a, b) sind Repo-positive Gliazellen unter den 8B7-positiven Faserkommissuren des Mittelhirns zu erkennen. Zu beachten ist, dass keine der Gliazellen 8B7 co-exprimiert. Bei 58%iger Embryogenese (Abbildung 4.5c, d) breitet sich eine kontinuierliche Population Repo-positiver Gliazellen von der Pars intercerebralis in die Kommissuren des Mittelhirns aus. Die Neuropile des Zentralkörpers haben sich zu diesem Zeitpunkt noch nicht gebildet. Bei einem embryonalen Entwicklungsstand von 70% (Abbildung 4.5e) haben sich die Repo-positiven Gliazellen des Mittelhirns umverteilt und umrunden nun das Neuropil des Zentralkörpers. Dieses Muster bleibt nun im Verlauf der Embryogenese erhalten (Abbildung 4.5f, g). Diese Gliazellen sind immer noch mit der Pars intercerebralis zusammenhängend (Abbildung 4.5h), wobei Repo-positive Gliazellen, die im Neuropil zwischen dem Ellipsoidkörper und dem Zentralkörper liegen (Abbildung 4.5 h), tatsächlich den Ellipsoidkörper umhüllen. Dies kann durch eine Rotation der

Abbildung 4.5i gezeigt werden. Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass die Gliazellen, die den Ellipsoidkörper umrunden, dorsal hinter dem Zentralkörper liegen. Somit befinden sich keine Gliazomata im Neuropil des Zentralkörpers.



**Abbildung 4.5: Verteilung Repo-positiver Gliazellen in Bezug auf sich entwickelnde neuronale Pfade im embryonalen Mittelhirn.**

Quelle: Boyan, Loser, Williams, Liu (2011). Dev. Genes Evol. 221, 141-155


### Erklärung zu Abbildung 4.5:

Konfokale Aufnahmen von Gehirnschnitten, die zuvor durch eine immunhistochemische Färbung mit dem gliaspezifischen Marker anti-Repo (grün) und dem axonspezifischen Marker anti-8B7 (rot) behandelt wurden. Man beachte, dass die Repo-positiven Gliazellen kein 8B7 Antigen exprimieren. **a** Bei 50%iger Embryogenese: Repo-positive Gliazellen (weiße Pfeilspitzen) trennen die 8B7-positiven Faserbündel der anterieuren und der posterioren Commissuren. Weißer Stern, Projektionen der



Primären pionier Kommissuren. Schwarzer Stern (in allen folgenden Abbildungen), Faserprojektionen zu den lateralen azzessorischen Loben (außerhalb des Schnittes). Pfeil zeigt nach anterior (a) und gilt für alle Teilabbildungen. **b** Konfokale Aufnahme des Gehirns bei 50%igem Entwicklungsstand in Seitenansicht. Repo-positive Gliazellen separieren die anterioren und posterioren Faserbündel. **c** 58%ige Embryogenese: Repo-positive Gliazellen (weiße Pfeilspitzen) der Pars intercerebralis bilden eine beständige Population mit den Zellen die zwischen den anterioren und posterioren lokalisiert sind. Weiße Sterne, Projektionen der Pionierneurone der ersten Gehirnkommisur. **d** Die konfokale Aufnahme zeigt das Gehirn in seitlicher Ansicht bei 58%iger Embryogenese. Repo-positive Gliazellen (weiße Pfeilspitzen) teilen die anterioren und posterioren Faserbündel. **e** Bei 70%iger Embryogenese: Das Neuropil des Zentralkörpers formt sich, und Repo-positive Gliazellen (weiße Pfeilspitzen) verteilen sich um den Zentralkörper um diesen zu umhüllen. **f** Bei 80%iger Embryogenese: Repo-positive Gliazellen (weiße Pfeilspitzen) umhüllen die neuropile Region des Zentralkörpers. Innerhalb des Zentralkörpers sind keine Repo-positiven Gliazellen zu finden. **g** Bei 85%iger Embryogenese: Abbildung eines Gehirnschnittes auf Höhe der säulenförmigen Fasern (schwarze Pfeilspitzen) im Zentralkörper. Repo-positive Gliazellen umhüllen den Zentralkörper und ordnen sich entlang der säulenförmigen anterioren und posterioren Faserbündel an. **h** Bei 80%iger Embryogenese (nur den grünen Kanal betreffend): Repo-positive Gliazellen in der Pars intercerebralis und um den Zentralkörper formen eine beständige Population. Gliazellen (weiße Pfeilspitzen) grenzen den Ellipsoidkörper vom Zentralkörper ab. **i** Rotation der Abbildung in **h** um zu bekräftigen, dass die Gliazellen, die den Ellipsoidkörper umhüllen, nicht im Zentralkörper sondern tiefer im Gehirn liegen. Maßstab in **h** repräsentiert 45 µm in **a-d**, 60 µm in **e**, 50 µm in **f**, 45 µm in **g**, und 55 µm in **h** und **i**

### Abkürzungen in Abbildung 4.5:

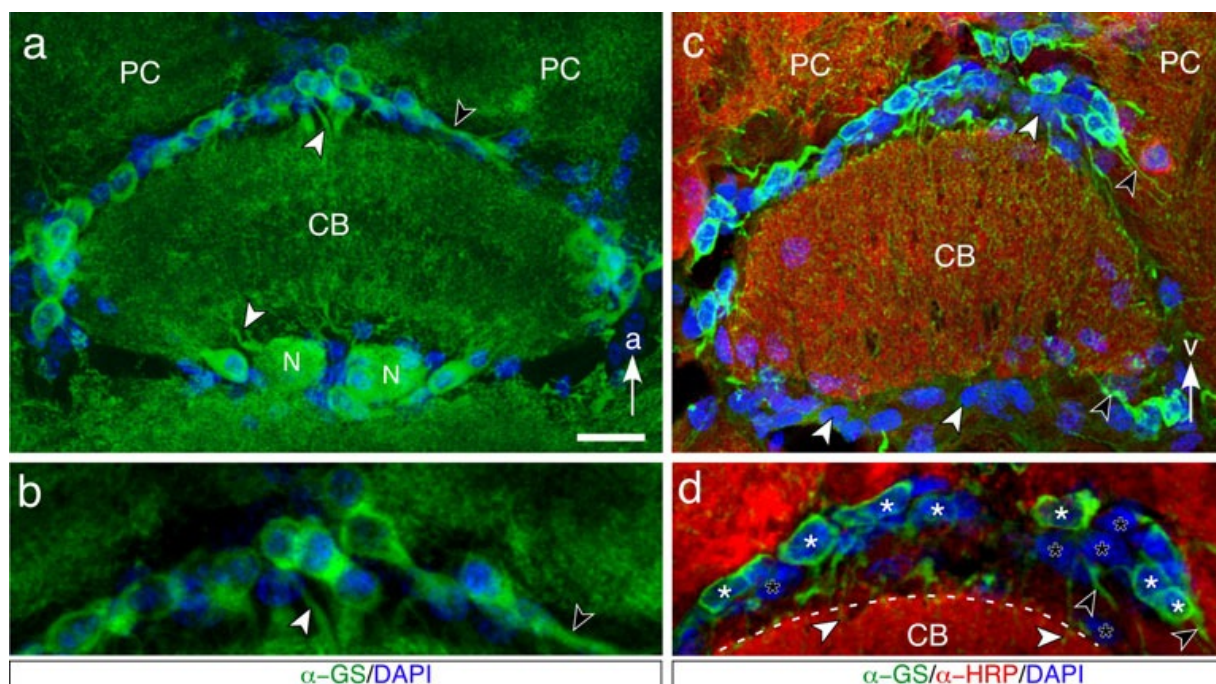
ac anteriore Kommissur. EB Ellipsoidkörper. pc posteriore Kommissur. PI Pars intercerebralis.  Grenze der Neuropilregionen.

## 4.2 Identifizierung und Zuordnung der Gliazellen zu astrozytenähnlichen Gliazellen

Da der gliaspezifische Marker Repo nicht zytoplasmatisch, sondern im Zellkern exprimiert wird, können die Prozesse der Gliazellen nicht visualisiert werden. Dies beschränkt die Interpretation der Interaktion von Gliazellen und Neuronen während der Entwicklung des Neuropils. Der Marker Glutaminsynthetase (GS), für den in dieser Arbeit ein Protokoll etabliert wurde, ist im Vertebratengehirn spezifisch für Astrozyten (Martinez-Hernandez et al., 1977; Ward et al., 2004; van der Hel et al., 2005; Saitoh und Toshiyuki 2010). Die Expression von GS im Gehirn von Crustacea zeigt Projektionen gliaähnlicher Zellen (Harzsch und Hansson 2008).

#### 4.2.1 Das Enzym Glutaminsynthetase markiert Gliazellen und deren Projektionen im Mittelhirn

Um zu bekräftigen, dass GS auch als Marker im Mittelhirn der Heuschrecken exprimiert wird, wurde zunächst eine Doppelfärbung (anti-GS/DAPI; Abbildung 4.6a) durchgeführt. Die Zellkörper, die den Zentralkörper im Laufe der Embryogenese umhüllen, exprimieren GS zytoplasmisch und nicht im Zellkern. Diese GS-positiven Zellen senden Prozesse in und um das Neuropil des Zentralkörpers (Abbildung 4.6a, b). Eine Doppelfärbung mit dem Marker anti-GS und dem neuronspezifischen Marker HRP zeigt (Abbildung 4.6c, d), dass keine der GS-positiven Zellen, die den Zentralkörper umhüllen, HRP-positiv sind. Diese Zellen haben daher keinen neuronalen Ursprung. Abbildung 4.6 zeigt außerdem das Vorhandensein einiger DAPI-positiv gefärbter Zellkerne, die jedoch eine GS-negativ/HRP-negative Färbung aufweisen. Diese Zellen könnten einen Repo-positiven/GS-negativen Typ von Gliazellen repräsentieren, welche im Laufe der Ergebnisse näher beschrieben werden (siehe Abbildung 4.7).




**Abbildung 4.6:** Die Glutaminsynthetase (GS)-positiven Zellen im Mittelhirn sind keine Neurone.

Quelle: Boyan, Losser, Williams, Liu (2011). Dev. Genes Evol. 221, 141-155

### Erklärung zu Abbildung 4.6:

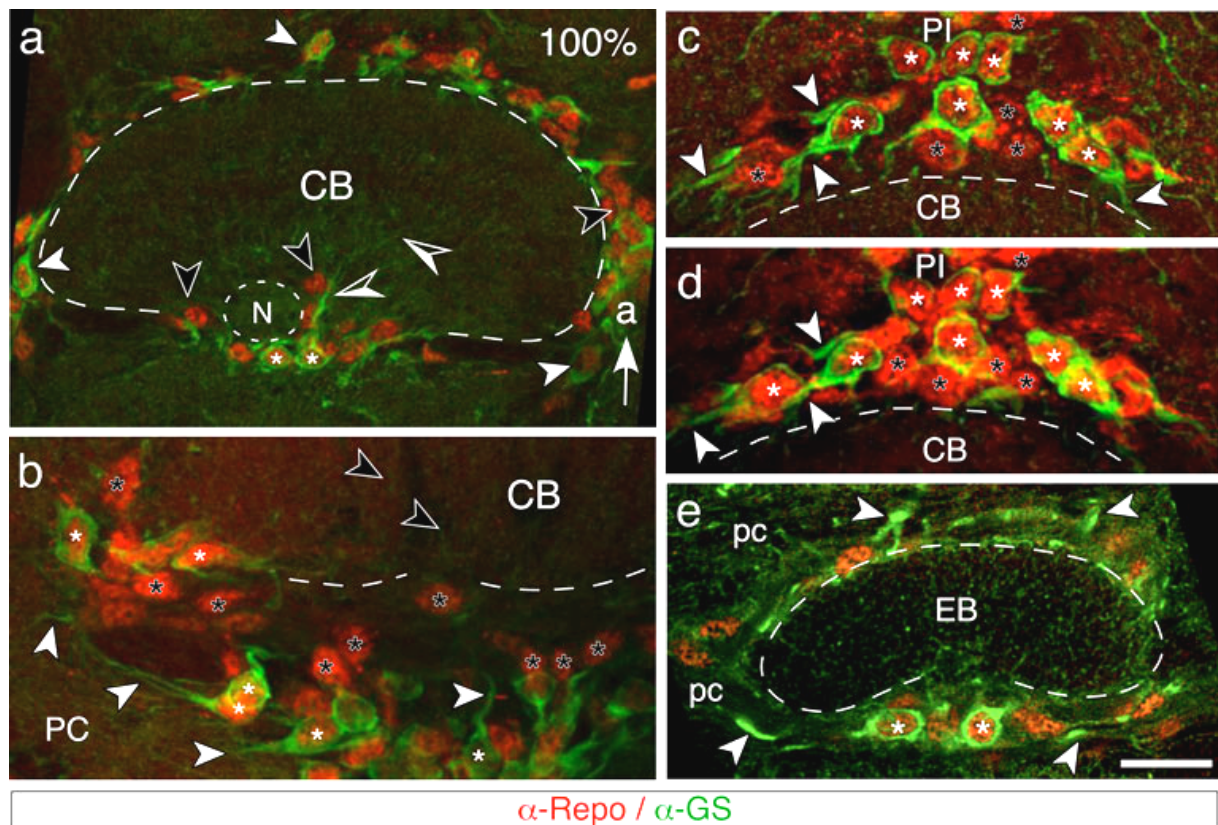
Alle Abbildungen repräsentieren einen embryonalen Entwicklungsstand von 100%. Pfeilspitze in **a** und **b** zeigt nach anterior; in **c** und **d** nach ventral. **a** Die Abbildung einer konfokalen Aufnahme des Mittelhirns (Frontalschnitt) auf Höhe des Zentralkörpers und Noduli nach erfolgter Doppelfärbung (anti-GS, grün; DAPI, blau) zeigt kortikale Glutaminsynthetase Expression in Zellen, die den Zentralkörper umhüllen. Zelluläre Projektionen (schwarze Pfeilspitze) begrenzen das Neuropil des Protocerebrums und Projizieren in dessen Neuropil (weiße Pfeilspitzen). Man beachte die Dichte der Glutaminsynthetase Expression in den Noduli. **b** Höhere Auflösung der Abbildung **a** über dem Zentralkörper (anterior) zeigt Zellkörper und deren mit DAPI gefärbten Zellkernen samt kortikaler Glutaminsynthetase Expression, die Projektionen um (schwarze Pfeilspitze) oder in (weiße Pfeilspitze) den Zentralkörper senden. **c** Die konfokale Aufnahme eines Horizontalschnittes des Mittelhirns nach erfolgter Dreifachfärbung (anti-GS, grün; anti-HRP, rot; DAPI, blau) lässt, GS-positive/HRP-negative Zellen mit Projektionen (schwarze Pfeilspitzen) und GS-negative/HRP-negative/DAPI-positive Zellkörper (weiße Pfeilspitzen), die den Zentralkörper umrunden, erkennen. Alle Zellen weisen keine co-Expression von HRP auf (welches Fasern im CB färbt, rot), und haben demnach keinen neuronalen Ursprung. **d** Höhere Auflösung der Abbildung **c** der Region ventral zum Zentralkörper zeigt GS-positive/HRP-negative/DAPI-positive Zellen (weiße Sterne) mit Projektionen, die das HRP-positive (neuronale) Neuropil des Zentralkörper umrunden (schwarze Pfeilspitzen) oder in dies hinein projizieren (weiße Pfeilspitzen). Ein Komplex nicht neuronaler Zellen zeigt eine GS-negative/HRP-negative/DAPI-positive Färbung (schwarze Sterne). Maßstab repräsentiert in **a** 35 µm, 20 µm in **b**, 30 µm in **c**, und 20 µm in **d**

### Abkürzungen in Abbildung 4.6:

CB Zentralkörper. N Noduli. PC Protocerebrum.  Grenze des Zentralkörpers.

Die Tatsache, dass die erwähnten GS-positiven Zellen, die mit dem im Mittelhirn gelegenen Zentralkomplex zusammenhängen, keinen neuronalen Charakter aufweisen, erlaubt noch nicht die Folgerung, dass es sich um Gliazellen handelt. Um die Gliaidentität dieser Zellen zu bestätigen wurde eine Doppelfärbung mit anti-GS und dem nachgewiesenen gliaspezifischen Marker Repo durchgeführt (Abbildung 4.7). Alle GS-positiven Zellen, die den Zentralkomplex bei einem embryonalen Entwicklungsstand von 100% umhüllen, sind gleichzeitig Repo-positiv (Abbildung 4.7a, b). Diese Zellen senden Projektionen um oder in das Neuropil des Zentralkörpers (Abbildung 4.7a-d) und des Ellipsoidkörpers (Abbildung 4.7e). Des Weiteren sind GS-positive Projektionen in den Faserkommissuren zu finden (Abbildung 4.7e). Die hier aufgezeigten Gliazellen gehören demnach generell zur Gruppe der Neuropilgliazellen.

Die Ergebnisse zeigen ein weiteres einhergehendes besonderes Merkmal der Gliadentität im Mittelhirn: während alle GS-positiven Zellen gleichzeitig auch Repo-positiv sind, sind nicht alle Repo-positiven Zellen gleichzeitig GS-positiv (Abbildung 4.7d). Dies führt zu der Annahme, dass es zwei deutliche immunocytochemische Untereinheiten von Gliazellen, die mit dem Mittelhirn assoziiert sind, gibt: die GS-/Repo-positiven Zellen, welche die Mehrheit der Gliazellen im Mittelhirn repräsentieren, und eine Minderheit, welche die GS-negativen/Repo-positiven Gliazellen repräsentieren. Die Doppelfärbung (GS/Repo) bekräftigt molekular, wie auch morphologisch, dass die GS-positiven Zellen einen Neuropil-, astrozytenähnlichen Typ Gliazellen im Mittelhirn der Heuschrecken repräsentieren.



**Abbildung 4.7: Glutaminsynthetase-positive Zellen im protocerebralen Mittelhirn.**

Quelle: Boyan, Losser, Williams, Liu (2011). Dev. Genes Evol. 221, 141-155

### Erklärung zu Abbildung 4.7:

Die Glutaminsynthetase-positiven Zellen weisen eine co-Expression von Repo auf und sind somit Gliazellen. Zwei deutlich immunologische Untergruppen von Gliazellen sind mit dem Zentralkomplex verknüpft. Konfokale Aufnahmen von Frontalschnitten bei 100%iger Embryogenese nach erfolgter Doppelfärbung (anti-Repo, rot, anti-Glutaminsynthetase (GS), grün). Pfeil in **a** zeigt nach anterior und bezieht sich auf alle Abbildungen (**a - e**). **a** Gliazellen, die den Zentralkörper umhüllen, zeigen zwei

Expressionsmuster. Alle GS-positiven Zellen exprimieren im Zellkern Repo und GS kortikal (weiße Pfeilspitzen). Ein Komplex an Zellen ist Repo-positiv/GS-negativ (schwarze Pfeilspitzen). Repo-positiv/GS-positive Zellen (weiße Sterne), die mit den Noduli assoziiert sind, senden Projektionen (schwarz-weiße Pfeilspitzen) in den Zentralkörper. **b** zeigt Repo-positiv/GS-positive Gliazellen (weiße Sterne) und Repo-positiv/GS-negative Gliazellen (schwarze Sterne) posterior zum Zentralkörper. Gliaprojektionen, die das protocerebrale Neuropil umgeben (weiße Pfeilspitzen), und Gliaprojektionen in das Neuropil des Zentralkörpers (schwarze Pfeilspitzen) sind zu erkennen. **c** Repo-positiv/GS-positive Gliazellen (weiße Sterne) und Repo-positiv/GS-negative Gliazellen (schwarze Sterne) bilden die Region der Pars intercerebralis anterior zum Zentralkörper. Man beachte die ausgedehnten GS-positiven Projektionen (weiße Pfeilspitzen). **d** zeigt dieselbe Präparation wie in **c**, jedoch in einer anderen optischen Tiefe. Dies lässt Repo-positiv/GS-negative Gliazellen (schwarze Sterne) unter der Population der Repo-positiven/GS-positiven Gliazellen (weiße Sterne) und deren GS-positiven Projektionen (weiße Pfeilspitzen) erkennen. **e** Repo-positiv/GS-positive Gliazellen (weiße Sterne) senden Projektionen (weiße Pfeilspitzen) in Faszikel des posterioren kommissuralen Systems um den Ellipsoidkörper. Man beachte die ausgedehnten GS-positiven Verzweigungen innerhalb des Ellipsoidkörpers. Maßstab in **e** repräsentiert 50  $\mu\text{m}$  in **a**, 25  $\mu\text{m}$  in **b**, 20  $\mu\text{m}$  in **c**, 20  $\mu\text{m}$  in **d**, und 25  $\mu\text{m}$  in **e**

### Abkürzungen in Abbildung 4.7:

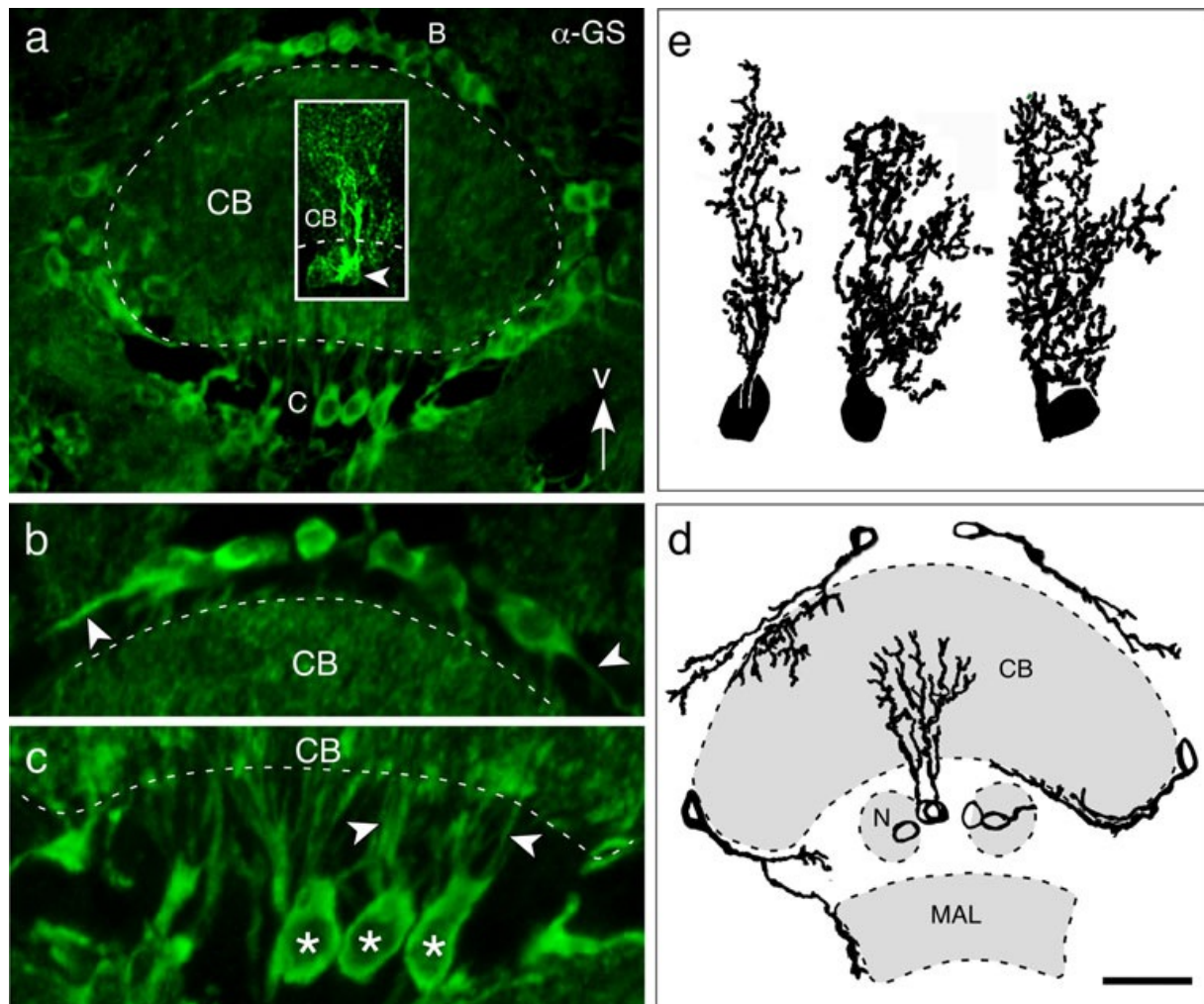
CB Zentralkörper. EB Ellipsoidkörper. N Noduli. PC protocerebrales Neuropil. pc posteriores kommissurales System. PI Pars intercerebralis. --- Grenze der Neuropilregionen.

### 4.2.2 Gliaprojektionen, die mit den Modulen des Zentralkomplexes in Zusammenhang stehen

Da der Marker Glutaminsynthetase nun zur Visualisierung der Gliaprozesse eingesetzt werden kann, wird im Weiteren die Assoziation der Projektionen mit den Modulen des Zentralkomplexes, wie dem Zentralkörper, erforscht. Konfokale Aufnahmen der GS-positiven Gliazellen, die mit dem Zentralkörper assoziiert sind (Abbildung 4.8 a-c) lassen zwei Hauptarten von Projektionstypen erkennen. Der erste Projektionstyp beinhaltet Zellen die morphologisch einen umhüllenden Typ zu erkennen geben (Abbildung 4.8 a, b, d). Die Projektionen dieses Typs umhüllen das Neuropil des Zentralkörpers eher als Projektionen in den Zentralkörper hinein senden. Ein zweiter Projektionstyp sendet beträchtliche Verzweigungen in und durch das Neuropil des Zentralkörpers (Abbildung 4.8a (*weißer Schaukasten*), c, d). Rekonstruktionen des letzteren astrozytenähnlichen Zelltyps (Abbildung 4.8e) weisen Verzweigungen auf, welche sich eher säulenartig und nicht lateral im Zentralkörper ausbreiten. Da der Ursprung der Zellkörper in einem lateralen Bereich angeordnet ist



(Abbildung 4.8c), formen die Projektionen innerhalb des Zentralkörpers auch einen fächerförmigen Bereich.



**Abbildung 4.8: Morphologische Muster und Muster der Projektionen GS-positiver astrozytenähnlicher Gliazellen bei 80%iger Embryogenese, die mit dem Zentralkörper assoziiert sind.**


Quelle: Boyan, Loser, Williams, Liu (2011). Dev. Genes Evol. 221, 141-155

## Erklärung zu Abbildung 4.8:

Pfeilspitze in **a** zeigt nach ventral und ist für alle Teilabbildungen gültig. **a** Konfokale Aufnahme zeigt GS-positive Gliazellen, die den Zentralkörper umrunden und Projektionen (weiße Pfeilspitzen) in den Zentralkörper senden. In dessen Neuropil kommt es zu umfangreichen Verzweigungen (Kasten). **b** Die konfokale Aufnahme zeigt GS-positive Gliazellen oberhalb (ventral zum Zentralkörper) des Zentralkörpers mit seitlichen Projektionen (weiße Pfeilspitzen), die den Zentralkörper umhüllen. **c** Die konfokale Aufnahme zeigt den Umfang der Projektionen (weiße Pfeilspitzen) GS-positiver Gliazellen (weiße Sterne) in den Zentralkörper. **d** Zeichnungen einzelner GS-positiver/HRP-negativer Gliazellen bei 80%iger Embryogenese, die von konfokalen seriellen Aufnahmen nachkonstruiert sind. Eine Population sendet Projektionen um das Neuropil des Zentralkörpers um diesen einzuhüllen. Die andere Population sendet Projektionen in das Neuropil des Zentralkörpers hinein. Man beachte, dass die Zellkörper der Gliazellen vor den Noduli, und nicht innerhalb dieser liegen. **e** Zeichnungen

einzelner astrozytenähnlicher Gliazellen bei höherer Vergrößerung zeigen Einzelheiten der Verzweigungen innerhalb des Zentralkörpers (siehe Kasten in **a**). Die Zeichnungen wurden anhand serieller konfokaler Aufnahmen rekonstruiert. Maßstab in **d** repräsentiert 50 µm in **a**, 55 µm im Kasten in **a**, 30 µm in **b**, 20 µm in **c**, 45 µm in **d**, und 30 µm in **e**

### Abkürzungen in Abbildung 4.8:

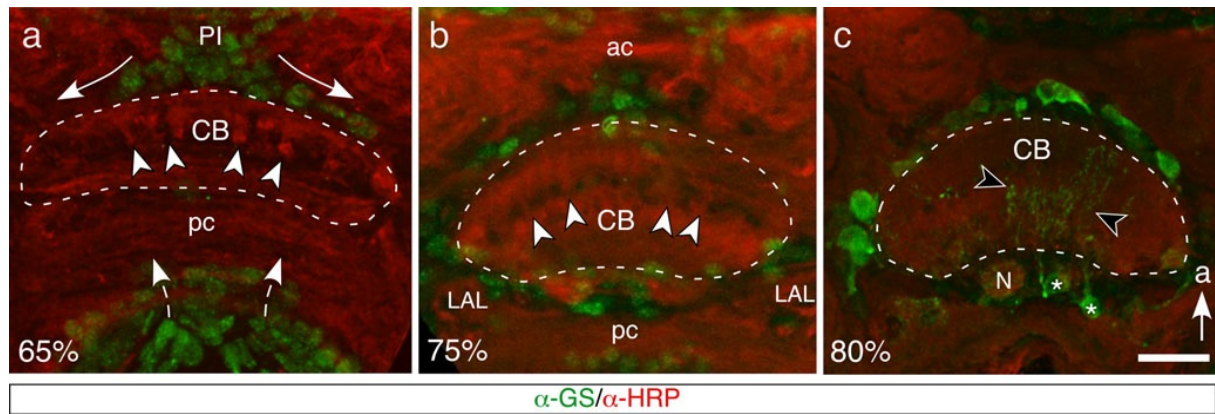
CB Zentralkörper. MAL median azzessorische Loben. N Noduli. B verweist auf 4.8 b. C verweist auf 4.8 c.  Grenze der Neuropilregionen.

### 4.2.3 Das Auftreten der Gliaprozesse im Zentralkörper

Eine auftretende Frage in Bezug auf die Interaktion zwischen Gliazellen und Neuronen im Zentralkomplex ist, ob sich die Projektionen der Gliazellen vor, nachdem oder während der neuronalen Prozessausbildung entwickeln. Um diese Frage zu beantworten wurde eine GS/HRP Doppelfärbung zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Embryogenese durchgeführt, um das Auftreten der Gliaprojektionen in den Zentralkörper zu verfolgen (Abbildung 4.9).

Bei 65%iger Embryogenese (Abbildung 4.9a) beginnt das Neuropil des Zentralkörpers sich zu formen und es beginnen sich HRP-positive (neuronale) säulenartige Projektionen zu bilden. GS-positive/HRP-negative Gliazellen breiten sich lateral aus der Pars intercerebralis aus und beginnen den Zentralkörper zu umhüllen. Signifikant ist, dass keine GS-positiven Gliaprozesse innerhalb des sich entwickelnden Zentralkörpers zu finden sind. Bei 75%iger Embryogenese (Abbildung 4.9b) sind HRP-positive säulenartige Trakte innerhalb des Zentralkörpers klar präsent und GS-positive/HRP-negative Gliazellen umrunden den Zentralkörper. Es sind aber immer noch keine Gliaprojektionen innerhalb des Neuropils zu erkennen. Bei 80%iger Embryogenese (Abbildung 4.9c) sind nun großflächige GS-positive/HRP-negative Gliaprojektionen von Zellen, die nahe der Noduli lokalisiert sind, durch das Neuropil des Zentralkörpers präsent.

Die erhobenen Daten zeigen, dass die Projektionen GS-positiver Gliazellen sich erst in das Neuropil des Zentralkörpers erstrecken, nachdem sich die charakteristische säulenartige Neuroarchitektur gebildet hat. Es bleibt der Nachweis zu erbringen ob eine Assoziation zwischen Gliazellen und neuronal säulenbildenden Projektionen innerhalb des Zentralkörpers besteht und wenn dem so ist, ob sie kausal ist.



**Abbildung 4.9: Das Auftreten der Projektionen von Gliazellen innerhalb des Zentralkörpers.**

Quelle: Boyan, Loser, Williams, Liu (2011). Dev. Genes Evol. 221, 141-155

### Erklärung zu Abbildung 4.9

Konfokale Aufnahmen frontaler Hirnschnitte bei unterschiedlichem embryonalen Entwicklungsstand nach erfolgter Doppelfärbung (anti-Gs, grün/anti-HRP, rot). Pfeil zeigt nach anterior und gilt für alle Teilabbildungen. **a** Bei 65%igem embryonalem Entwicklungsstand: das Neuropil des Zentralkörpers bildet sich. Erste HRP-positive (neuronale) säulenartige Projektionen (weiße Pfeilspitzen) sind sichtbar. GS-positive/HRP-negative Gliazellen breiten sich lateral aus der Pars intercerebralis aus (weiße Pfeile) und beginnen den Zentralkörper zu umhüllen. Zu diesem Zeitpunkt sind keine GS-positiven Gliaprozesse innerhalb des sich entwickelnden Zentralkörpers auszumachen. HRP-positive Fasern der posterioren Kommissur sind sichtbar. **b** Bei 75%iger Embryogenese: HRP-positive säulenartige Trakte (weiße Pfeilspitzen) innerhalb des Zentralkörpers sind deutlich zu erkennen. GS-positive/HRP-negative Gliazellen umrunden den Zentralkörper, es sind jedoch keine Gliaprojektionen innerhalb des Neuropils vorhanden. **c** Bei 80%igem embryonalem Entwicklungsstand: umfangreiche GS-positive/HRP-negative Gliaprojektionen (schwarze Pfeilspitzen) von Zellen (weiße Sterne), die teilweise in der Nähe der Noduli lokalisiert sind, sind im gesamten Zentralkörper zu finden. Maßstab in **c** repräsentiert 35 µm in **a** und **b**, 55 µm in **c**

### Abkürzungen in Abbildung 4.9:

ac anteriore Kommissur. CB Zentralkörper. LAL laterale azzessorische Loben. N Noduli. pc posteriore Kommissur. PI Pars intercerebralis. --- Grenze des Zentralkörpers.



### **4.3 Astrozytenähnliche Gliazellen sind über gap junctions miteinander gekoppelt und bilden ein zelluläres Netzwerk**

Wie bereits gezeigt (siehe Abbildung 4.9) formen sich die Neuropile des Zentralkomplexes mit dessen erwähnten Modulen während der letzten Hälften der Embryogenese. Bei einem Entwicklungsstand von 80% hat die Verteilung der Gliazellen um dieses Neuropil bereits den Entwicklungsstand wie bei adulten Tieren. Auch die Bildung der Gliapodien ist bei einem embryonalen Entwicklungsstand von 80% bereits weit fortgeschritten. Die folgenden Kapitel beschäftigen sich nun mit der Frage, ob die beschriebenen GS-positiven Gliazellen, die den Zentralkörper umrunden, ein zelluläres Netzwerk via gap junctions bilden. Gleichzeitig wird erstmals untersucht, ob die Bildung der Gliapodien einen maßgeblichen Anteil an der Kommunikation der Gliazellen untereinander hat.

Für die folgenden beschriebenen Injektionsexperimente wurde zum einen der embryonale Entwicklungsstand von 100% kurz nach dem Schlüpfen der Tiere gewählt, um zunächst zu testen, ob diese Gliazellen durch Zellkopplung untereinander verbunden sind. Zum anderen wurde für die Injektionsxperimente ein embryonaler Entwicklungsstand von 70% gewählt, um die Frage des Einflusses der Gliapodien zu klären. Dafür wurden Zellen an vier verschiedenen Stellen in Bezug auf die neuronale Architektur des Zentralkomplexes für die intrazelluläre Injektion gewählt (Abbildung 4.4d).

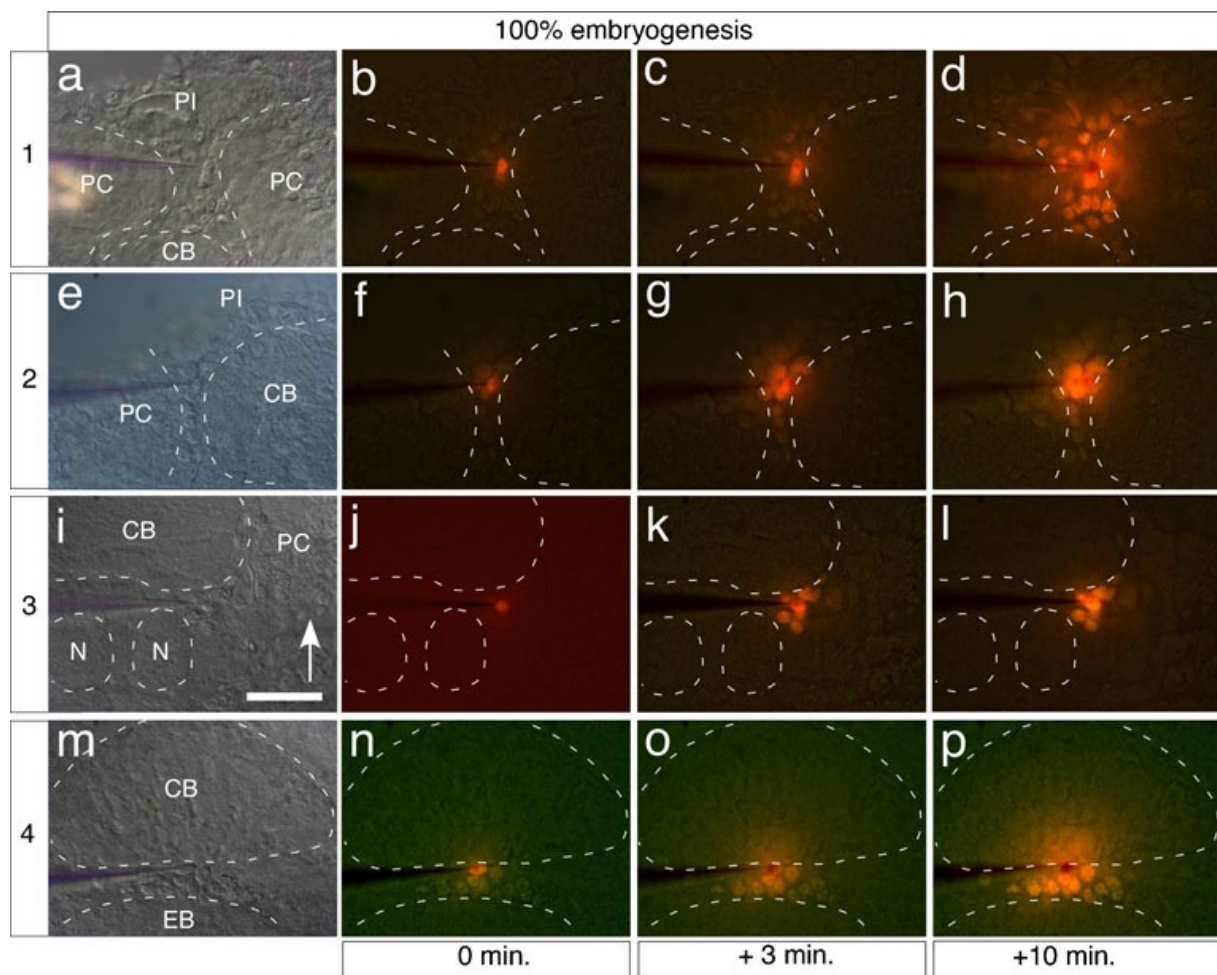
#### **4.3.1 Muster der Zellkopplung bei 100% (nach Schlüpfen)**

Injektionspunkt 1 liegt zwischen dem Neuropil des Zentralkörpers und der Pars intercerebralis – einer Region, in der migrierende Gliazellen identifiziert wurden (Boyan et al., 2011); Injektionspunkt 2 liegt zwischen dem hoch strukturierten Neuropil des Zentralkörpers, dem sogenannten diffusen Neuropil, welches lateral im Protocerebrum liegt; Injektionspunkt 3 liegt zwischen dem Neuropil des Zentralkörpers und den lateralen azzessorischen Loben (*LAL*); Injektionspunkt 4 liegt dorsal zwischen dem Zentralkörper, dem Ellipsoidkörper (*EB*) und den mehr posterior liegenden Noduli (*N*).

Intrazelluläre Injektionen des Fluorochroms Alexa<sup>®</sup> 568 in individuelle Zellen, die den Zentralkörper umrunden, weisen eine Population von gekoppelten Zellen an jeder der vier getesteten Injektionsstellen auf (Abbildung 4.4d; 4.10). Zellkopplung wurde beim Injizieren von Alexa Fluor<sup>®</sup> 568, Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 und Lucifer yellow beobachtet. Dabei hat sich gezeigt, dass das Fluorochrom Alexa Fluor<sup>®</sup> 568 bei Weitem überzeugt hat was die Rate der Farbstoffverteilung, die Intensität der Färbung und seine Einbehaltung in gefärbten Zellen angeht. Die Mikroinjektionen wurden 31 mal durchgeführt, wobei die Zellkopplung bei 25 Ergebnissen zu beobachten war (81%). Bei jedem Experiment wurden die Zellen, die unter DIC optics zu sehen waren, für die Mikroinjektionsexperimente willkürlich gewählt. Bei den Ergebnissen, bei denen die Zellkopplung fehlgeschlagen ist, wurde eine wiederholte Penetration an einem anderen Injektionspunkt im selben Hirnschnitt vorgenommen, wobei das Ergebnis bezogen auf die Zellkopplung dann immer positiv ausfiel. Diese Fehlversuche könnten darauf beruhen, dass die Zellkopplung bei diesen Zellen nicht besteht, oder dass es zu einem früheren Zeitpunkt zu einer Entkopplung der Zellen kam.

Es bestehen für jede Injektion an jeder getesteten Stelle photomikrographische Daten (DIC optics), welche die Glaskapillare, die in der zu färbenden Zelle lokalisiert sind, zeigen (Abbildung 4.10 a, e, i, m), dann die Färbung zum Zeitpunkt der Strominitiierung (0 min) (Abbildung 4.10b, f, j, n), nach dreiminütiger Dauer (Abbildung 4.10c, g, k, o) und schließlich nach zehnminütiger Farbstoffinjektion (Abbildung 4.10d, h, l, p). Die Farbstoffinjektion verlief kontinuierlich, und im Falle einer Erfolgreichen Injektion begann der Farbstoff sich von der injizierten Zelle innerhalb von 3 Minuten zu ihrer Nachbarzelle auszubreiten. Das Muster der Zellkopplung nach zehnminütiger Injektion veränderte sich auch bei längerer Farbstoffinjektion nicht. Eine nähere Betrachtung der Daten zeigt verschiedene Merkmale der Zellkopplung: (a) die DIC Bilder (Abbildung 4.10a, e, i, m) zeigen Zellen unfixierter, gefrorener Hirnschnitte. Die Gewebserhaltung wurde gewährleistet um Vergleiche mit Hirnschnitten der herkömmlichen alternativen histologischen Fixierungs- und Färbemethoden zu vergleichen (siehe Boyan et al., 2011); (b) die intrazelluläre Elektrode war stets bis zur Beendigung des Experiments in gleicher Position (Abbildung 4.10 d, h l, p), was eine unkontrollierte Injektion des Farbstoffs in benachbarte Zellen verhindert; und (c) gefärbte Zellen können mehrere Durchmesser

Entfernung von der injizierten Zelle entfernt, und durch nicht gefärbte Zellen separiert sein. Diese Daten weisen erstens darauf hin, dass der Transfer des Farbstoffs via intersomalem Kontakt nicht das einzige Mittel der Zellkopplung ist, und zweitens, dass es zu keiner Färbung aufgrund eines Ausströmens des Farbstoffes während der Mikroinjektion kommt. Um zu kontrollieren, ob es zu einem extrazellulären „wash over“ Effekt kommt, wurde der Farbstoff in einen extrazellulären Raum mit einer kleinen Anhäufung von Gliazellen injiziert. Der Farbstoff wurde von keiner Zelle dieses Clusters, oder etwa einer benachbarten Zelle aufgenommen. Wenn dem Zellmedium zusätzlich ein erwiesener gap junction Blocker beigefügt wurde, kam es zu keinem Austreten des Farbstoffs aus der injizierten Zelle und keine anderen Zellen wurden gefärbt (siehe unten).



**Abbildung 4.10: Zellkopplung zwischen vermeintlichen Gliazellen.**


Quelle: Boyan, Liu, Loser (2012). Dev. Genes Evol. 222, 125-138

### Erklärung zu Abbildung 4.10:

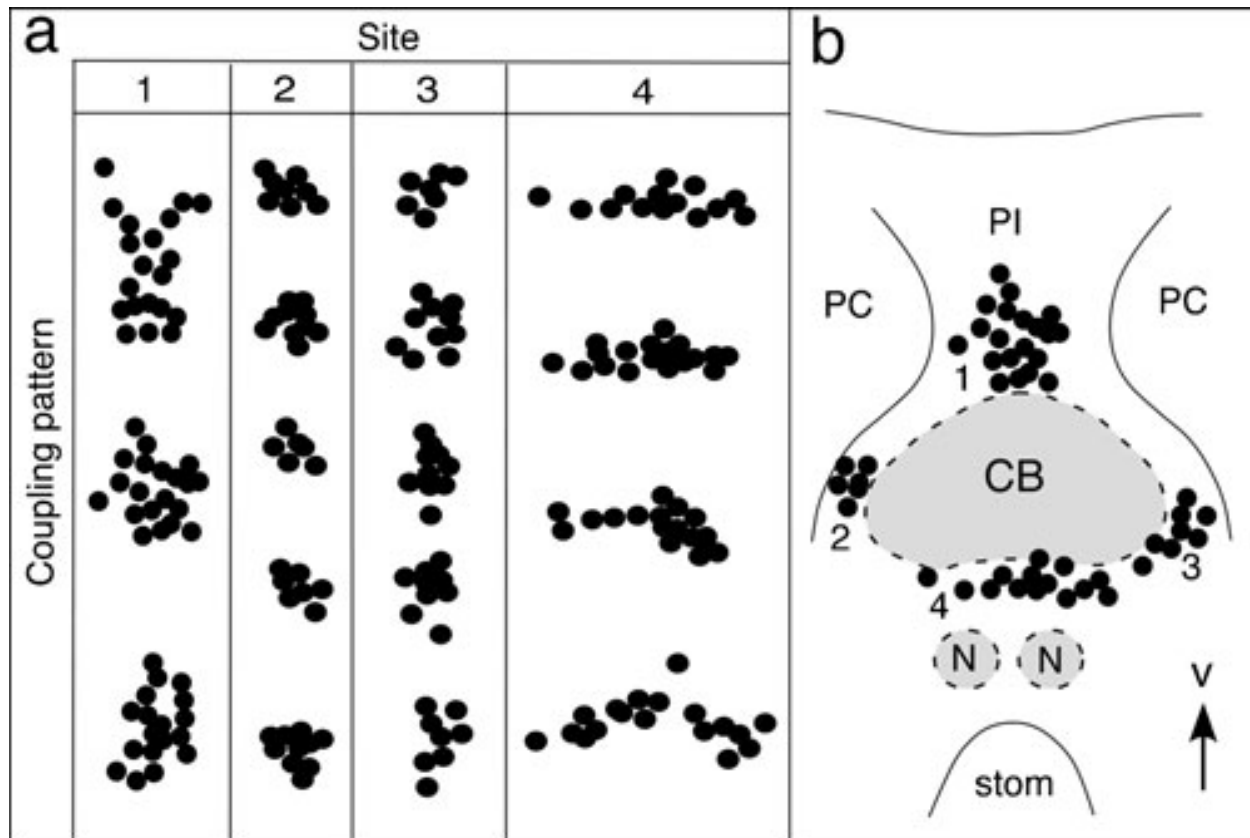
Zellkopplung nach erfolgter intrazellulärer Injektion von Alexa Fluor® 568 in Gehirnschnitte bei 100%iger Embryogenese in eine einzelne Zelle an vier verschiedenen Injektionspunkten (1-4 siehe

Abbildung 4.4d und 4.11) um den Zentralkörper herum. Die Glaskapillare bleibt während der Dauer des Experiments immer an gleicher Stelle. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden alle am Beginn der Penetration der einzelnen Zellen gemacht (DIC: **a, e, i, m**), bei jeweiligem Beginn der Farbstoffinjektion (0 min., **b, f, j, n**), nach 3-minütiger Farbstoffinjektion (**c, g, k, o**) und nochmals nach Vervollständigung des Experiments (+10 min., **d, h, l, p**). Die Farbstoffinjektion wurde über diesen Zeitraum aufrechterhalten. Während des Verlaufs der Farbstoffinjektion erkennt man eine Anhäufung von gekoppelten Zellen mit einer stereotypischen Konfiguration auf jeder der Seiten. Neuropilregionen sind gekennzeichnet und in den mikroskopischen Aufnahmen beschriftet (**a, e, i, m**). Die fluoreszenten Bilder sind ebenfalls mikroskopische Aufnahmen, und daher keine konfokalen Aufnahmen. Gleichzeitige Illumination mit durchlässigem Licht zeigt nicht gekoppelte Zellen und führt zu geringen Farb-, bzw. Belichtungsunterschieden bei den jeweiligen unterschiedlichen Aufnahmen. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit UV-Filter Einstellungen aufgenommen. Dies führt zu einer Abschwächung des Hintergrundes, jedoch zur Rendering des Fluorochroms Alexa<sup>®</sup> 568. Pfeilspitze in **i** zeigt nach ventral und ist für jede Teilabbildung gültig. Maßstab repräsentiert 73 µm in jeder Teilabbildung.

### Abkürzungen zu Abbildung 4.10:

CB Zentralkörper. EB Ellipsoidkörper. N Noduli. PC Protocerebrum. PI Pars intercerebralis.  Grenze der Neuropilregionen.

Bei wiederholten Versuchen scheint das Muster der Zellkopplung an den entsprechenden Stellen hinreichend konsistent zu sein, zugleich aber unterschiedlich, vergleicht man es mit den anderen Injektionspunkten von Mustern, die an anderen Stellen zu sehen sind (mit Ausnahme von Stelle 2 und 3, die sehr ähnlich sind). Daraus kann man schließen, dass verschiedene Subpopulationen von Gliazellen involviert sind (Abbildung 4.11a). Die gekoppelten Gliazellen an den Injektionspunkten 2 und 3 scheinen kompakter organisiert zu sein im Vergleich zu den Stellen 1 und 4, welche ausgedehnte Areale präsentieren. Dies könnte sich auf die anatomischen Begebenheiten, die an den verschiedenen Injektionsstellen herrschen, beziehen (Abbildung 4.4d). Injektionspunkt 1 liegt ventral zum Zentralkörper und dehnt sich in die Pars intercerebralis aus, welche eine weitreichende kortikale Region ist; Injektionspunkt 2 und 3 sind zwischen dem Zentralkörper und dem benachbarten protocerebralem Neuropil eingeschlossen; Injektionspunkt 4 liegt dorsal zum Zentralkörper und die Zellen können sich lateral zu beiden Seiten hin ausbreiten. Sie sind aber weiter dorsal durch die Faserkommissuren, durch den Ellipsoidkörper (**EB**) und weiter posterior durch die Noduli (**N**) begrenzt.



**Abbildung 4.11: Schematische Darstellung des Musters der Zellkopplung bei 100%iger Embryogenese.**

Quelle: Boyan, Liu, Loser (2012). Dev. Genes Evol. 222, 125-138

#### **Erklärung zu Abbildung 4.11:**

Die Abbildung zeigt das Muster der Zellkopplung nach erfolgter intrazellulärer Injektion des Fluorochroms Alexa Fluor® 568 in eine einzelne Zelle (siehe Abbildung 4.10). **a** Die schwarzen Punkte repräsentieren die jeweiligen Orte (1-4) des Mikroinjektionsexperiments. Die Experimente wurden an jedem der vier repräsentativen Orte mehrfach durchgeführt: drei Wiederholungen an Injektionspunkt 1, fünf Wiederholungen an Injektionspunkt 2 und 3, und vier Wiederholungen an Injektionspunkt 4. Unterschiede im Abgleich der Experimente an einer der vier bestimmten Injektionsstellen (1-4) führt zu leichten Unterschieden in der Orientierung und der Sektionsfläche des originalen Hirnschnittes. **b** Zeichnung der Mittelhirnregion aktueller horizontaler übereinandergelegter Hirnschnitte mit repräsentativen Zellanhäufungen gekoppelter Zellen der Injektionsexperimente an den Stellen 1-4. Die Zeichnungen wurden anhand der unterschiedlichen Präparationen zusammengestellt. Pfeilspitze in **b** zeigt nach ventral.

#### **Abkürzungen in Abbildung 4.11:**

CB Zentralkörper. N Noduli. PC Protocerebrum. PI Pars intercerebralis. stom Stomodeum. --- Grenze der Neuropilregionen.

Auch die Anzahl der gekoppelten Zellen an den jeweiligen Injektionspunkten unterscheidet sich (Tabelle 4.1). Vergleiche der Anzahl der gekoppelten Zellen aus

20 Experimenten zeigen, dass ein Mittelwert von 19 Zellen (Spanne, 18-20;  $n=3$ ) an Injektionspunkt 1 untereinander gekoppelt sind; ein Mittelwert von 7 Zellen (Spanne, 4-10,  $n=8$ ) sind am Injektionspunkt 2 untereinander gekoppelt; ein Mittelwert von 9 Zellen (Spanne, 7-10,  $n=5$ ) sind an Injektionspunkt 3 untereinander gekoppelt; und ein Mittelwert von 17 Zellen (Spanne, 14-18;  $n=4$ ) sind an Injektionspunkt 4 untereinander gekoppelt. Die Beispielgrößen sind zu klein um eine statistische Analyse durchzuführen, jedoch unterstützen diese Daten den visuellen Eindruck eines regulierten Durchströmens des Farbstoffs von Zelle zu Zelle, so dass das Muster der Zellkopplung stereotypisch für jeden aufgenommenen Injektionspunkt ist.

**Tabelle 4.1: Vergleich des Mittelwertes gefärbter Zellen resultierend aus Zellkopplung.**

Alter	Injektionspunkte			
	1	2	3	4
70%	22 (20-25) $n=3$	7 (6-8) $n=4$	11 (0) $n=2$	12 (11-12) $n=2$
100%	19 (18-20) $n=3$	7 (4-10) $n=8$	9 (7-10) $n=5$	17 (14-18) $n=4$

Quelle: Boyan, Liu, Loser (2012). Dev. Genes Evol. 222, 125-138. (modifiziert)

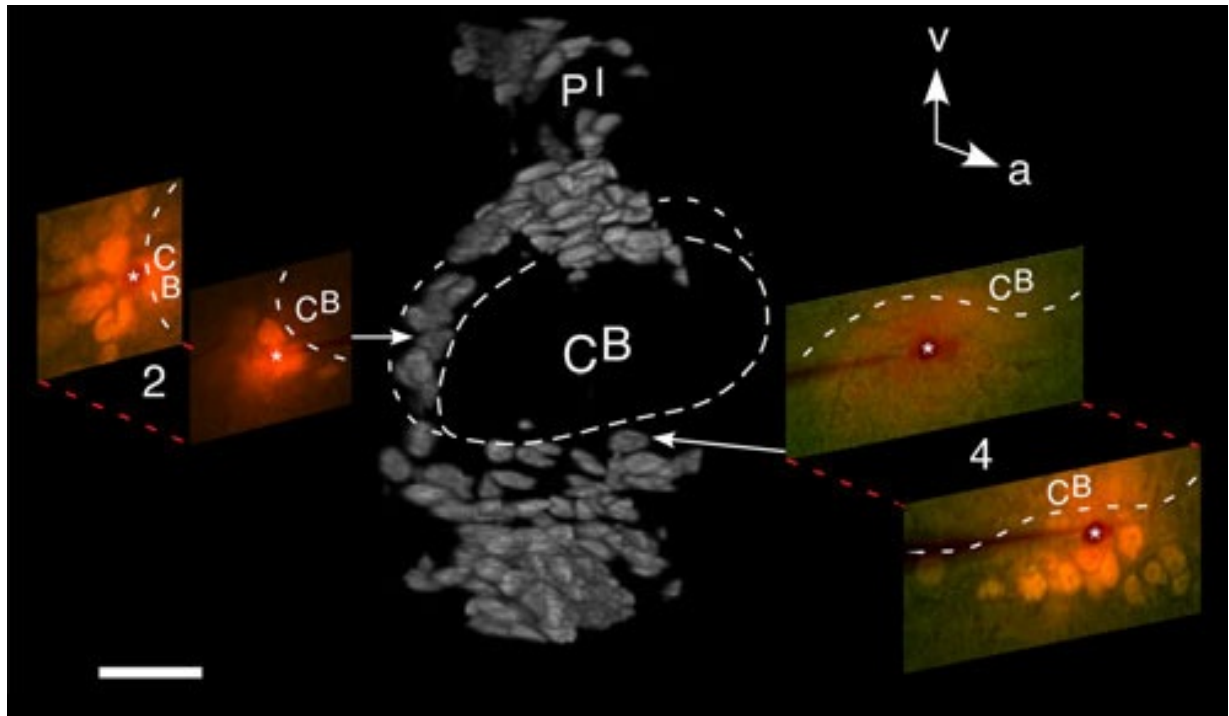
### Erklärung Tabelle 4.1:

Die Mittelwerte ergeben sich nach erfolgter intrazellulärer Mikroinjektion in eine individuelle Gliazelle an jeder der vier Injektionspunkte (1-4, siehe Abbildung 4.11) um den Zentralkörper bei 70%iger und 100%iger Embryogenese. Wertebereich (in Klammern) und die Zahl der Observationen ( $n$ ) sind gegeben.

Ein weiterer Faktor, der berücksichtigt werden muss, ist inwieweit die Felder der gekoppelten Zellen sich möglicherweise überlappen, und ob dies zu den Informationsprozessen innerhalb des Glianetzwerkes beiträgt. In den erwähnten Experimenten wurde eine einzelne Gliazelle an einem der vier Injektionspunkte mit Farbstoff gefüllt (Abbildung 4.4d und 4.10). Eine Bildbearbeitung der gekoppelten, gefärbten Zellen, die den Zentralkörper umrunden (Abbildung 4.11b), lässt darauf schließen, dass zusätzliche eingelagerte Injektionsexperimente zu dem Ergebnis führen, dass es eine Zellpopulation gibt, die ein untereinander gekoppeltes Netzwerk

von Gliazellen bildet, welche den Zentralkomplex komplett umhüllen. Dennoch kann nicht behauptet werden, dass diese Population eine einzelne Einheit an funktionierenden Zellen repräsentiert.

Die 2D-Ansicht der gekoppelten Zellen erlaubt also bis jetzt nicht zu schätzen wie hoch der Anteil der gekoppelten Zellen an der Gesamtpopulation an den jeweiligen Injektionspunkten ist. Auf diese Problematik wurde mittels Mikroinjektionen an einer jeweiligen repräsentativen Stelle an zwei aufeinanderfolgenden Hirnschnitten derselben Präparation eingegangen. So wurde es ermöglicht eine Schnitttiefe von 32  $\mu\text{m}$  zu erreichen und die Gesamtzahl der gefundenen gekoppelten Zellen zu erfassen. Die repräsentativen Injektionspunkte, die gewählt wurden, waren die Injektionspunkte 2 und 4 (siehe Abbildung 4.4d). Die erhaltenen Ergebnisse wurden dann mit konfokalen Daten, die von Hirnschnitten mit ähnlicher Dicke (50  $\mu\text{m}$ ) und äquivalenter anatomischer Tiefe im Hirn stammten, verglichen, nachdem eine DAPI Färbung und 3D Rekonstruktionen durchgeführt worden waren. Dies erlaubt und visualisiert einen Vergleich aller Zellen an allen einzelnen Injektionspunkten (Abbildung 4.12). Die Anzahl der gekoppelten Zellen, welche von den zwei sukzessiven Hirnschnitten aufgenommen wurden, sind 14 Zellen an Injektionspunkt 2 und 23 Zellen an Injektionspunkt 4. Die Daten, welche von fünf Präparationen nach einer DAPI Färbung abgeglichen wurden, zeigen einen Mittelwert von 16.0 Zellen ( $\text{SD} \pm 2.55$ ) an Injektionspunkt 2, und an Injektionspunkt 4 einen Mittelwert von 23.2 Zellen ( $\text{SD} \pm 8.44$ ). Die Abbildungen der zwei Sets der Ergebnisse können nicht als beweiskräftig angesehen werden, aber letztendlich kann man daraus schließen, dass die Mehrheit der Zellen an jedem Injektionspunkt gekoppelt sind, und dass der Zentralkörper gewissermaßen von einem 3D Netzwerk gekoppelter Zellen umhüllt ist.



**Abbildung 4.12:** Die Zellkopplung zeigt, dass die meisten Zellen bei 100%iger Embryogenese um den Zentralkörper herum gefunden wurden.

Quelle: Boyan, Liu, Loser (2012). Dev. Genes Evol. 222, 125-138

### Erklärung zu Abbildung 4.12:

Die Teilabbildungen zeigen fluoreszente fotomikrographische Aufnahmen fortlaufender Hirnschnitte (rote gestrichelte Linie, kombinierte Dicke 32 µm) an jeder der beiden Injektionspunkte (2 und 4), die mit dem Zentralkörper assoziiert sind. Durch Injektion des Farbstoffes Alexa Fluor® 568 in eine einzelne Zelle (weißer Stern) sind gekoppelte Zellen in jedem der Schnitte vorhanden. Die Daten der Zellkopplung wurden mit einem 3D Bild eines 50 µm dicken Hirnschnittes, nach erfolgter DAPI Färbung der gleichen Schnittebene im Mittelhirn verglichen (weiße Pfeile), um die komplette Zellpopulation an den jeweiligen Injektionspunkten zu verdeutlichen. Die Grenze des Zentralkörpers ist durchgehend gekennzeichnet. Die Daten der Injektionspunkte 2 und 4 sind aus unterschiedlichen Präparationen. Alle Abbildungen sind in schräger Ansicht dargestellt, um ein Tiefenprofil entstehen zu lassen. Man beachte, dass die anterior gelegene Abbildung an Injektionspunkt 4 aus Teilen der Daten aus Abbildung 4.10 besteht. Maßstab repräsentiert 44 µm für die Aufnahmen der Injizierten Zellen, 29 µm für die konfokale Abbildung

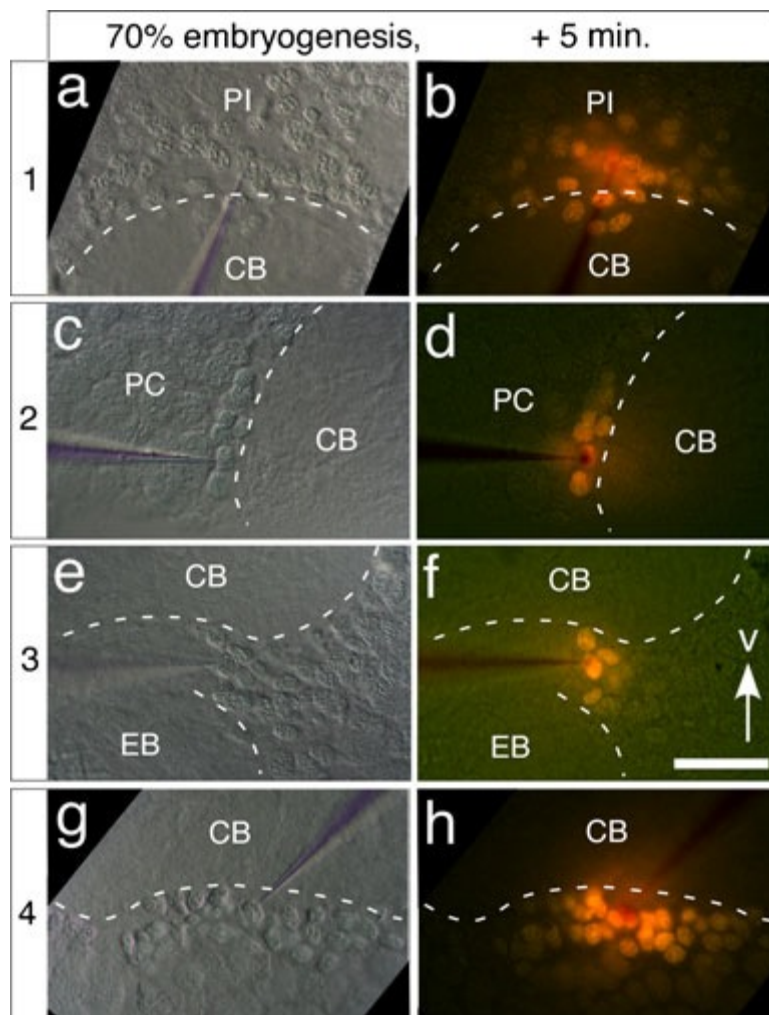
### Abkürzungen in Abbildung 4.12:

CB Zentralkörper. PI Pars intercerebralis. --- Grenze des Zentralkörpers.



### 4.3.2 Muster der Zellkopplung bei 70% (verlaufender Embryogenese)

Die Frage, die sich nun ergibt, ist, wann sich das Muster der Zellkopplung, welches zuvor beschrieben wurde, etabliert: kurz bevor der Embryo schlüpft oder schon früher während der Embryogenese? Um dies zu klären, wurden die Experimente zu einem früheren Zeitpunkt, bei einem embryonalen Entwicklungsstand von 70%, durchgeführt. Dieses Alter wurde gewählt, da sich zu diesem Zeitpunkt der Embryogenese die Neuroarchitektur des Zentralkomplexes zu entstehen beginnt, und die Gliazellen ihre Bestimmungsorte rund um dieses sich entwickelnde Neuropil einnehmen, um zur postembryonalen Entwicklung beizutragen (siehe Abbildung 4.9 und Abbildung 4.16).



**Abbildung 4.13: Zellkopplung zwischen vermeintlichen Gliazellen.**


Quelle: Boyan, Liu, Loser (2012). Dev. Genes Evol. 222, 125-138

#### Erklärung zu Abbildung 4.13:

Zellkopplung nach erfolgter intrazellulärer Injektion von Alexa Fluor® 568 in Gehirnschnitte bei 70%iger Embryogenese in eine einzelne Zelle an vier verschiedenen Injektionspunkten (1-4) um den

Zentralkörper herum. Injektionspunkte, experimentelle Bedingungen und die Aufnahmen der Bilder sind die gleichen wie bei dem zuvor beschriebenen Injektionsexperiment bei 100%iger Embryogenese (siehe Abbildung 4.10). Die mikroskopischen Aufnahmen wurden alle am Beginn der Penetration der einzelnen Zellen gemacht (DIC: **a, c, e, g**), und nochmals nach Vervollständigung des Experiments (+5 min., **b, d, f, g**). Die Anhäufung der gekoppelten Zellen weisen für jeden der Injektionspunkte eine stereotypische Konfiguration auf und sind mit den zuvor erhobenen Daten bei 100%iger Embryogenese (Abbildung 4.10 und 4.11) fast identisch. Die neuropilen Regionen sind durch eine gestrichelte weiße Linie gekennzeichnet. Die Fluoreszenzaufnahmen sind photomikrographische Aufnahmen und daher keine konfokalen Bilder. Pfeilspitze in Teilabbildung **f** zeigt nach ventral. Maßstab repräsentiert 60 µm und ist für alle Teilabbildungen gültig.

### **Abkürzungen in Abbildung 4.13:**

CB Zentralkörper. EB Ellipsoidkörper. PC Protocerebrum. PI Pars intercerebralis.  Grenze der Neuropilregionen.

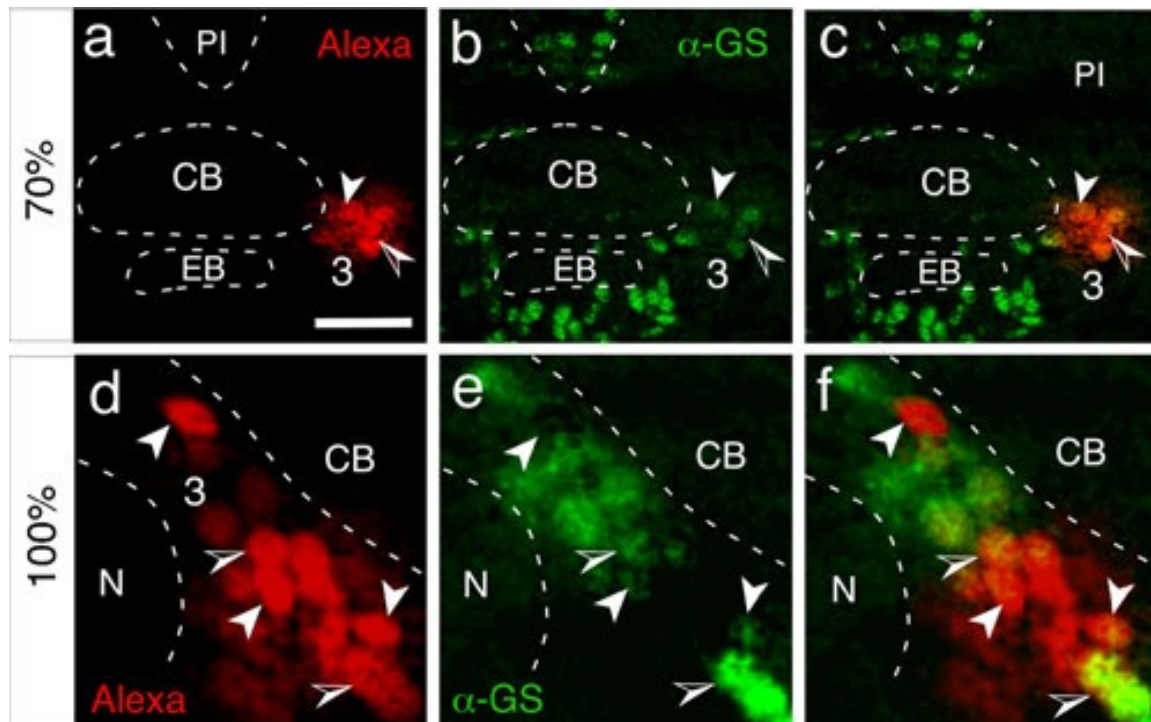
Die Zellkopplungsexperimente wurden an 16 Präparationen durchgeführt, an den gleichen Injektionspunkten wie bei 100%igem Entwicklungsstadium (Abbildung 4.13). In den Zellen der Hirnschnitte, in die injiziert wurde, zeigte sich das gleiche histologische Erscheinungsbild wie bei 100%igem Entwicklungsstand (siehe Abbildung 4.10). Nach kontinuierlicher 5-minütiger Injektion des Farbstoffes in eine einzelne Zelle zeigte sich eine Population gekoppelter Zellen in 11 der 16 Präparationen (Abbildung 4.13, Tabelle 4.1). Das Muster der Zellkopplung war stereotypisch für die jeweiligen Injektionspunkte und nahezu identisch mit dem Muster, das bei einem 100%igem Entwicklungsstand erkennbar ist (siehe Abbildung 4.10 und 4.11). Obgleich die Probengröße der Zellen klein ist, ist die Anzahl der Zellen in jedem Cluster der gekoppelten Zellen ähnlich im Vergleich mit den Zellkopplungsexperimenten bei 100%igen Entwicklungsstand (Tabelle 4.1). Die Erfolgsrate der Zellkopplungsexperimente (69%) war im Vergleich zu denen bei 100%iger Embryogenese (81%) deutlich kleiner. Dies könnte mit dem Wendepunkt während der Entwicklung einhergehen, da bei 70%iger Embryogenese die Gliazellen des Zentralkomplexes erstmals ihre Gliapodien generieren (siehe Abbildung 4.16a, b). Die Daten werden so interpretiert, dass die genannten Präparationen einen auf den Entwicklungsstand bezogenen kleinen Vorsprung haben (100% Embryogenese), die Zellen daher mit ausgedehnteren Gliapodienkontakten versehen sind und die Zellkopplungsversuche daher einen Erfolg versprechen. Die Präparationen mit den Hirnschnitten, die etwas weniger weit entwickelt waren (70%), und daher nur wenige

oder noch keine Gliapodien generiert hatten, führten somit zum Ausbleiben der Zellkopplungen.

Die Daten lassen darauf schließen, dass seit der Lagefindung der Gliazellen um den Zentralkörper bei etwa 70%iger Embryogenese (siehe Abbildung 4.3) ein Netzwerk aus gekoppelten Zellen entsteht. Zellkopplungsversuche zu einem früheren Entwicklungsstand bei 50%iger Embryogenese zeigen mitunter auch Gruppen gekoppelter Gliazellen im Mittelhirn. Da der Zentralkomplex sich zu diesem Zeitpunkt jedoch noch nicht gebildet hat, ist es nicht möglich individuelle Gliazellen, welche nach deren Umlagern zum Aufbau der Module des Zentralkomplexes beitragen, zu identifizieren. Die Analyse wurde nicht weiter verfolgt. Demzufolge wurde die Analyse der Daten der Zellkopplungsversuche bei 50%igem Entwicklungsstand nicht in die Arbeit mit einbezogen.

### **4.3.3 Die gekoppelten Zellen sind Gliazellen**

Um zu verifizieren, dass die gekoppelten Zellen Gliazellen sind, wurden die Präparate sowohl bei 70%iger (Abbildung 4.14a-c), als auch bei 100%iger (Abbildung 4.14d-f) Embryogenese nach der erfolgten Farbstoffinjektion immunologisch behandelt. Bei 70%igem Entwicklungsstand zeigt die Analyse mit einem konfokalen Mikroskop eine Zelle am Injektionspunkt 3, die mit ihrem Nachbarn gekoppelt ist (Abbildung 4.14a). Die histochemische Färbung zeigt ein Cluster GS-positiver Zellen an derselben Stelle (Abbildung 4.14b). Die Kombination der konfokalen Bilder (Abbildung 4.14c) zeigt, dass alle injizierten Zellen GS-positiv sind, und bekräftigt daher, dass es sich um astrozytenähnliche Gliazellen handelt. Bei wiederholter Prüfung bei einem embryonalen Entwicklungsstand von 100% wurden drei Zellen separat an Injektionspunkt 4 zwischen dem Zentralkörper und den Noduli (Abbildung 4.14d) penetriert (siehe Abbildung 4.14d) und Farbstoff injiziert. Jede der penetrierten Zellen war zu mehreren Nachbarzellen durch Zellkopplung verbunden (Abbildung 4.14d). Durch eine histochemische Färbung mit anti-GS konnte wiederum gezeigt werden, dass alle gekoppelten Zellen auch GS-positive Zellen sind (Abbildung 4.14e). Die Auswertungen der konfokalen Bilder (Abbildung 4.14f) zeigen nach Kombination eine co-Lokalisation von Alexa 568 und Glutaminsynthetase, was wiederum bestätigt, dass beide, sowohl die Zellen, in die Farbstoff injiziert wurde als auch die gekoppelten Zellen, eine astrozytenähnliche Gliaidentität haben.



**Abbildung 4.14: Die gekoppelte Zellen sind astrozytenähnliche Gliazellen.**


Quelle: Boyan, Liu, Loser (2012). Dev. Genes Evol. 222, 125-138

#### **Erklärung Abbildung 4.14:**

Konfokale Aufnahmen von Gehirnschnitten bei 70%iger (a-c) und 100%iger (d-f) Embryogenese nach erfolgter Mikroinjektion von Alexa Fluor® 568 in eine einzelne Zelle (roter Kanal) und anschließender immunhistochemischer Färbung mit anti-GS (grüner Kanal). **a** Bei 70%iger Embryogenese, Mikroinjektion in eine einzelne Zelle (weiße Pfeilspitze) an Injektionspunkt 3 (siehe Abbildung 4.10) zeigt eine kleine Anhäufung gekoppelter Zellen (schwarz-weiße Pfeilspitze). **b** Die immunhistochemische Färbung (grüner Kanal) zeigt, dass die Zellanhäufung an Injektionsstelle 3 GS-positive astrozytenähnliche Gliazellen enthält. Die weiße Pfeilspitze zeigt auf die Zelle, die durch Mikroinjektion gefärbt wurde. Die schwarz-weiße Pfeilspitze zeigt auf die gekoppelten Zellen aus **a**. **c** Konfokale Aufnahme des selben Hirnschnittes wie in **a**, **b** dargestellt durch eine Kombination beider Kanäle rot/grün. Durch die Kombination beider Kanäle wird deutlich, dass die injizierte Zelle (weiße Pfeilspitze) und die gekoppelten Zellen (schwarz-weiße Pfeilspitze) auch eine GS-positive Färbung aufweisen (gelb) und daher astrozytenähnliche Gliazellen sind. **d** Bei 100%iger Embryogenese, Alexa Fluor® 568 wurde in einzelne Zellen (weiße Pfeilspitzen) an drei unterschiedlichen Orten innerhalb des Injektionspunktes 3 injiziert (roter Kanal). Die gekoppelten Zellen (schwarz-weiße Pfeilspitzen) sind mit der injizierten Zelle assoziiert. **e** Die immunhistochemische Färbung (grüner Kanal) zeigt GS-positive astrozytenähnliche Gliazellen (schwarz-weiße Pfeilspitzen) innerhalb der Zellanhäufung an Injektionspunkt 3. Die weiße Pfeilspitze deutet auf die injizierte Zelle aus **d**. **f** Konfokale Aufnahme desselben Hirnschnittes wie in **d**, **e** durch eine Kombination beider Kanäle rot/grün dargestellt. Durch die Kombination beider Kanäle wird wiederum deutlich, dass die injizierten Zellen (weiße Pfeilspitzen) und die gekoppelten Zellen (schwarz-weiße Pfeilspitzen) eine GS-positive Färbung aufweisen (gelb)

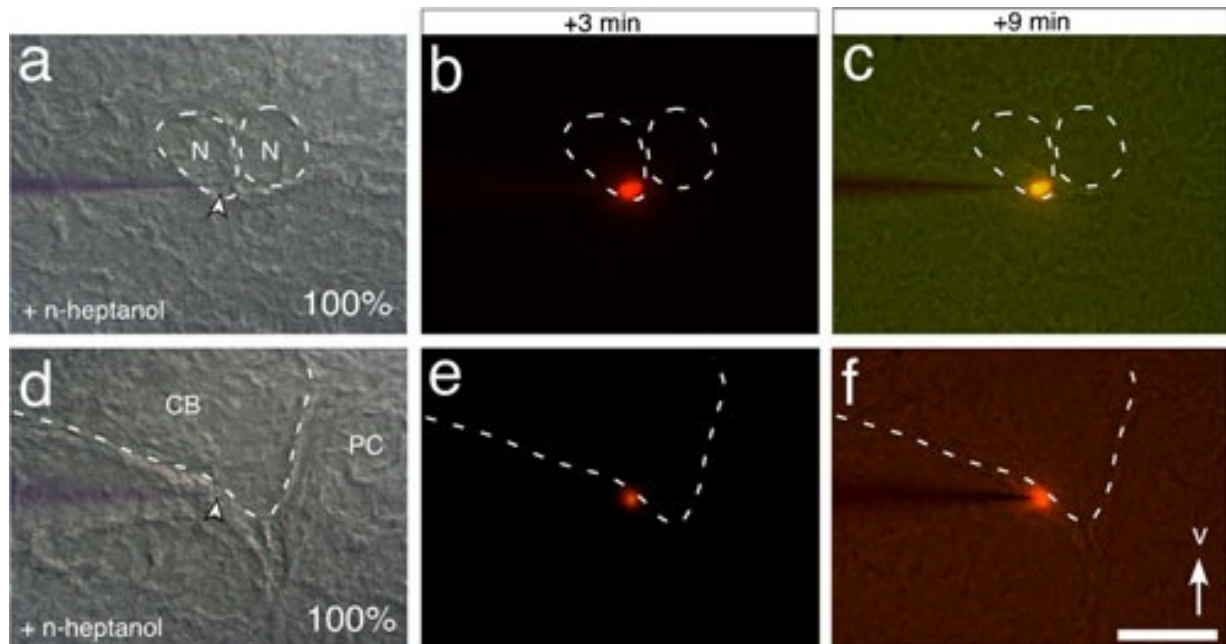
und daher also astrozytenähnliche Gliazellen sind. Maßstab in **a** repräsentiert 54  $\mu\text{m}$  in **a-c**, 21  $\mu\text{m}$  in **d-f**.

### Abkürzungen in Abbildung 4.14:

CB Zentralkörper. EB Ellipsoidkörper. N Noduli. PI Pars intercerebralis.  Grenze der Neuropilregionen.

### 4.3.4 Gap-junctional Blocker

Die anfängliche Kontrolle zeigt, dass der Farbstoff, welcher in den extrazellulären Raum, wie zuvor bei der Mikroinjektion zur Untersuchung der Zellkopplung, injiziert wurde, von keiner der Zellen in der näheren Umgebung aufgenommen wurde. Die Art und Weise des Transfers des Farbstoffs in die Hirnschnitte wurde durch die Zugabe des gap-junctional Blockers *n*-Heptanol in das Zellmedium nochmals verdeutlicht (Abbildung 4.15). Intrazelluläre Penetrationen der Zellen in erneuten Präparationen – die entweder mit dem Zentralkörper (Abbildung 4.15a-c) oder den Noduli assoziiert sind (Abbildung 4.15d-f) – und in die Farbstoff injiziert wurde, zeigen sogar nach 9 minütiger konstanter Injektion in Gegenwart von *n*-Heptanol, dass der Farbstoff weder aus der injizierten Zelle leckt, noch dass der Farbstoff sich auf benachbarte Zellen verteilt. Zur Kontrolle, dass es nicht zu einem missglückten Zellkopplungsexperiment gekommen ist, wurde in Zellen an anderen Injektionspunkten bei unterschiedlichen Hirnschnitten Farbstoff injiziert. Es wurde aber tatsächlich keine Zellkopplung nachgewiesen. Die Daten stimmen mit den gekoppelten Gliazellen, die den Zentralkörper umrunden, überein und zeigen somit, dass es sich um Zellen handelt, die über gap junctions miteinander kommunizieren und somit Teil eines zellulären Netzwerks sind.



**Abbildung 4.15:** *n*-Heptanol blockiert Zellkopplung zwischen Gliazellen die mit dem Zentralkomplex assoziiert sind.

Quelle: Boyan, Liu, Loser (2012). Dev. Genes Evol. 222, 125-138

### Erklärung zu Abbildung 4.15:

Photomikrographische Aufnahmen zweier Hirnschnitte (**a-c**, **d-f**) bei 100%iger Embryogenese nach intrazellulärer Injektion von Alexa Fluor® 568 in eine einzelne Gliazelle an unterschiedlichen, mit dem Neuropil des Zentralkomplex in Verbindung stehenden Injektionspunkten. Die Hirnschnitte befinden sich in einem Medium, das  $1 \times 10^{-5}$  M *n*-Heptanol enthält. Die Aufnahmen wurden zum Beginn der Penetration der Zelle (DIC: **a**, **d**), 3 min. nach Beginn der Farbstoffinjektion (**b**, **e**), und nach Beendigung des Experiments (+9 min., **c**, **f**) gemacht. Die Glaselektrode verblieb während der Injektion des Farbstoffs in der Zelle. Unterschiedliche Illumination des Hintergrundes mit durchlässigem Licht kann zu Farbabweichungen in den Fluoreszenzbildern führen. Durch die Zugabe von *n*-Heptanol in das Zellmedium kommt es zu keiner Zellkopplung. Pfeilspitze in **f** zeigt nach ventral. Maßstab repräsentiert 65 µm für alle Teilabbildungen.

### Abkürzungen in Abbildung 4.15:

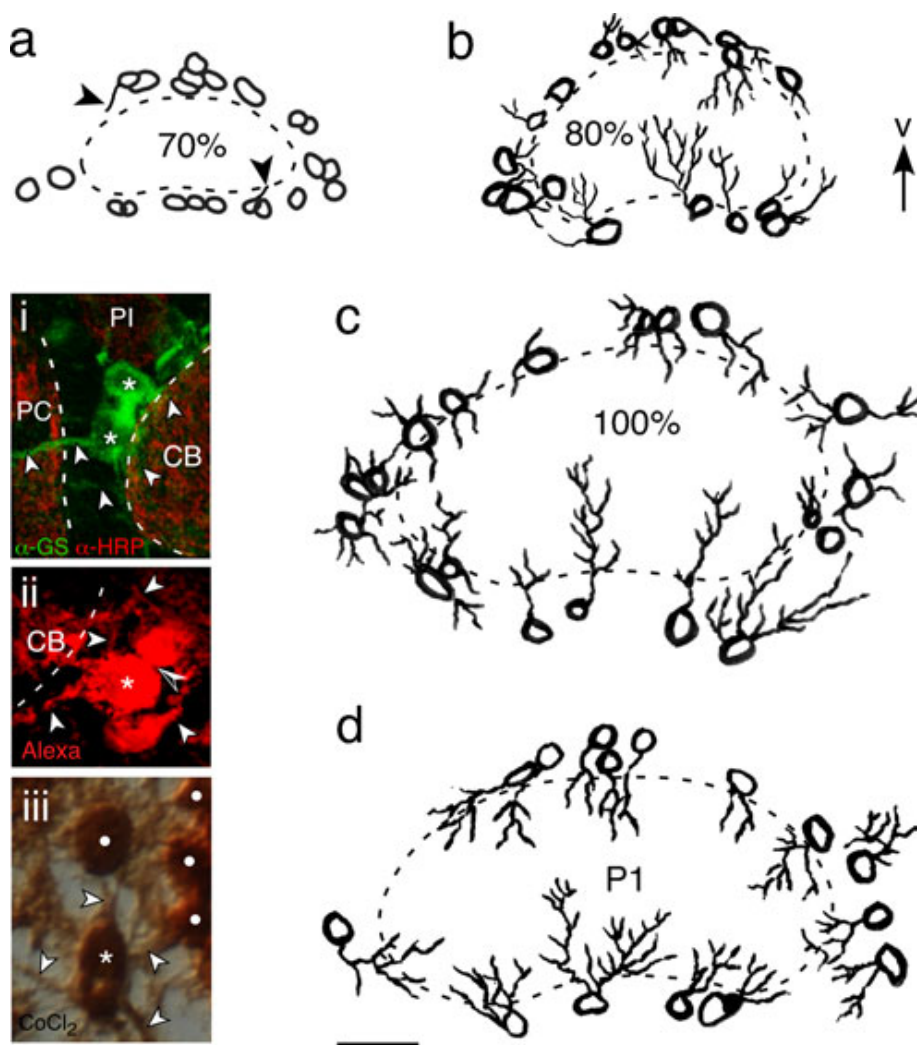
CB Zentralkörper. N Noduli. --- Grenze der Neuropilregionen.

### 4.3.5 Die Entwicklung der Gliaprojektionen (Gliapodia)

Die Ergebnisse der oben aufgeführten Zellkopplungsexperimente zeigen, dass nicht alle Zellkörper der gekoppelten Zellen in direktem physikalischem Kontakt zueinander stehen (siehe Abbildung 4.10). Dies lässt den Schluss zu, dass die Zellkopplung auf andere Art und Weise als durch Gliaprojektionen (Gliapodien) stattfindet. Dass die astrozytenähnlichen Gliazellen, die mit dem Zentralkomplex



assoziiert sind, in der späten Embryogenese ausgedehnte Projektionen generieren, die bis ins Neuropil reichen, kann durch immunhistochemische Färbung gezeigt werden (Abbildung 4.16 Kasten i). Dass diese Gliapodien sich auch untereinander kontaktieren und dass diese Kontakte möglicherweise bei der Zellkopplung involviert sind, ist durch das Netzwerk der Projektionen und die Verbindung der gekoppelten Zellen in der Nähe des Zentralkörperneuopils nach intrazellulärer Injektion entweder der Alexa<sup>®</sup> Fluorochrome (Abbildung 4.16, Kasten ii) oder durch Cobalt(II)-chlorid (Abbildung 4.16, Kasten iii), in einen einzelnen Zellkörper bei 100%iger Embryogenese, bewiesen.



**Abbildung 4.16:** Dendritische Projektionen astrozytenähnlicher Gliazellen im Verlauf von vier Entwicklungsstadien die mit dem Zentralkörper assoziiert sind.


Quelle: Boyan, Liu, Loser (2012). Dev. Genes Evol. 222, 125-138

#### Erklärung Abbildung 4.16:

Teilabbildung (i) zeigt eine konfokale Aufnahme GS-positiver/HRP-negativer astrozytenähnlicher Gliazellen (weiße Sterne) mit dendritischen Projektionen (weiße Pfeilsptzen) in den Zentralkörper, und

in protocerebrale Neuropilregionen des Mittelhirns, bei einem embryonalen Entwicklungsstand von 100%. Teilabbildung (ii) zeigt eine konfokale Aufnahme einer Zellanhäufung gekoppelter Gliazellen an der Grenze des Zentralkörpers nach erfolgter Injektion des Farbstoffs Alexa Fluor® 568 in eine der abgebildeten Zellen (weißer Stern), bei einem embryonalen Entwicklungsstand von 100%. Teilabbildung (iii) zeigt eine photomikrographische Aufnahme eines Hirnschnittes nach intrazellulärer Injektion von Cobalt(II)-chlorid in eine Gliazelle (weißer Stern) und anschließender Silbererintensivierung des Gewebes, bei einem embryonalen Entwicklungsstand von 100%. Zu beachten ist, dass das Netzwerk der gefärbten Projektionen (weiße Pfeilspitzen) zu einer Zellkopplung mit benachbarten Gliazellen führt (weiße Punkte). **a-d** Zeichnungen konfokaler Aufnahmen GS-positiver/HRP-negativer astrozytenähnlicher Gliazellen bei 70%iger Embryogenese, die mit dem Zentralkörper assoziiert sind (**a**), 80%iger Embryogenese (**b**), 100%iger Embryogenese (**c**) und des ersten postembryonalen (P1) Stadiums (**d**). Die Pfeilspitzen in **a** deuten auf den Beginn des Gliapodienwachstums. Pfeil in **b** zeigt nach ventral. Maßstab repräsentiert 20 µm in **i**, 15 µm in **ii** und **iii**, 32 µm in **a-d**.

### Abkürzungen in Abbildung 4.16:

CB Zentralkörper. PC Protocerebrum. PI Pars intercerebralis.  Grenze der Neuropilregionen.

Sobald im Laufe der Entwicklung des Protocerebrums solche Projektionen entstehen, können diese durch eine immunhistochemische Färbung bei 70% (Abbildung 4.16a), bei 80% (Abbildung 4.16b) und bei 100% des embryonalen Entwicklungsstandes sowie beim ersten Larvenstadium (Abbildung 4.16d) festgestellt werden. Rekonstruktionen der konfokalen Daten zeigen, dass bei 70%iger Embryogenese (Abbildung 4.16a) die Mehrheit der GS-positiven/HRP-negativen astrozytenähnlichen Gliazellen, die um den Zentralkörper lokalisiert sind, beginnen Gliapodien zu generieren. Bei einem embryonalen Entwicklungsstand von 80% (Abbildung 4.16b) haben die meisten Zellen auswachsende Prozesse, welche in den Zentralkörper einziehen oder sich um den Zentralkörper ausbreiten. Betrachtet man den Zeitpunkt bei 100%iger Embryogenese, erkennt man, dass alle GS-positiven/HRP-negativen Gliazellen Gliapodien ausgebildet haben. Dieses Projektionsmuster bleibt dann im Laufe der postembryonalen Entwicklung erhalten (Abbildung 4.16d).



## 5 Diskussion

Die Entwicklungsmechanismen, welche die Neuroarchitektur des Zentralkomplexes im Insektengehirn regulieren, werden immer besser verstanden, nicht zuletzt durch Erkenntnisse, die durch Mutationsanalysen gegeben sind (Strauss 2002). Solche Mutationsanalysen haben z.B. signifikante lokomotorische Defekte aufgezeigt, die mit spezifischen Fehlbildungen der Neuroarchitektur des Zentralkomplexes assoziiert sind (Strauss et al., 1992; Strauss und Heisenberg 1993; Ilius et al., 1994). Interessanterweise ist immer noch nicht bekannt, welche Zelltypen durch solche Mutationen betroffen sind - Neurone, Glia oder beide Zelltypen. Die Entwicklung der Gliazellen, die mit dem Zentralkörper assoziiert sind ist weitgehend unbekannt, während der Beitrag der Gliazellen zur neuronalen Entwicklung im ventral Bauchmark und im peripheren Nervensystem gut belegt ist (siehe Goodman and Doe 1994; Noordermeer et al., 1998; Rangarajan et al., 1999; Pielage und Klämbt 2001; Poeck et al., 2001; Sepp und Auld 2003; Page 2004; Learte und Hidalgo 2007), ist auch die Rolle der Gliazellen bei der Entwicklung des Zentralkomplexes ebenso unbekannt.

### 5.1 Der Gliamarker Glutaminsynthetase

Biochemisch betrachtet katalysiert das Enzym Glutaminsynthetase die Umsetzung von Ammoniak und Glutamat zu Glutamin (Wedler und Horn 1976). Im Säugerhirn befindet sich das Enzym Glutaminsynthetase in Gliazellen (Martinez-Hernandez et al., 1977), speziell in Astrozyten (Ward et al., 2004). Dort ist es in den Ablauf eingebunden den Neurotransmitter Glutamat in Glutamin umzuwandeln, nachdem dieser durch exitatorische Aminosäuretransporter (EAAT2 und EAAT4) aus dem synaptischen Spalt entfernt wurde (van der Hel et al., 2005). Außerdem spielt Glutaminsynthetase bei der Differenzierung von Schwann'schen Zellen, wiederum durch Regulierung der Glutamatkonzentration, eine Rolle (Saitoh und Toshiyuki 2010). Bei Invertebraten wurde gezeigt, dass das Enzym Glutaminsynthetase in gliaähnlichen Zellen, die das adulte Gehirnneuropil bei Crustacea einfassen, exprimiert wird (Harzsch und Hansson 2008). Unterschiedliche Forschungsergebnisse bekräftigen eine Beziehung zwischen Gliazellen und dem Glutamatstoffwechsel im Insektenganglion (siehe Carlson und Saint Marie 1990). Im Bezug auf den Zentralkomplex wurde in den säulenartigen Elementen des

Zentralkörpers in der adulten Heuschrecke eine Glutamatimmunreaktivität bewiesen (Homberg 2002) (Abbildung 5.4). Dies bietet die Basis zu den hier diskutierten Gliaprojektionen (Abbildung 4.8, 4.9). Deutlich unterschiedliche Typen von Gliazellen sind bei der embryonalen Entwicklung des Zentralkomplexes der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* beteiligt. Zunächst können diese Gliazellen als (a) Repo-positive/Glutaminsynthetase-positive Gliazellen, und (b) Repo-positive/Glutaminsynthetase-negative Gliazellen klassifiziert werden (Abbildung 4.7). Auf molekularer Ebenen sind alle GS-positiven Gliazellen, die die Neuropile des Zentralkomplexes umhüllen, auch gleichzeitig Repo-positiv. Jedoch sind nicht alle Repo-positiven Gliazellen gleichzeitig GS-positiv. Beide Zellentypen sind HRP-negativ (Abbildung 4.4, 4.6), jedoch reicht die HRP-Negativität allein nicht aus um Zellen als Gliazellen zu klassifizieren (Loesel et al., 2006; Gocht et al., 2009). Auf zellulärer Ebene umrunden die hier untersuchten Gliazellen die Neuropile des sich entwickelnden Zentralkomplexes und unterteilen diesen in seine einzelnen, bereits beschriebenen Strukturen.

Wie schon in der Einleitung beschrieben sind im Bauchmark der Heuschrecke unterschiedliche Gliazellen beschrieben. So finden sich Transportgliazellen, Subperineuralgliazellen, Cell-body Gliazellen, Satellite Gliazellen Axon hillock Gliazellen, sogenannte Glia Glia, Treacheal Gliazellen und Neuropilgliazellen. Diesbezüglich ähneln die hier untersuchten Gliazellen den Neuropilgliazellen, welche bereits bei der Untersuchung des thorakalen Ganglions der adulten Heuschrecke (Hoyle 1986), und des Neuropils des Mittelhirns der embryonalen Heuschrecke (Vanhems 1985), beschrieben wurden. In den Neuropilen anderer Spezies wurden ähnliche Zellen beschrieben, wie z.B. in den Glomeruli der Antennenloben des Tabakschwärmers *Manduca* (Oland und Tolbert 1987, 1989) oder den zentralen Neuropilen der Honigbiene (Hähnlein und Bicker 1997), des Schmetterlings (Nordlander und Edwards 1969) und bei *Drosophila* (Ito et al., 1994; Hartenstein et al., 1998; Peraanu et al., 2005). Der Funktion der Neuropilgliazelle, welche in den verschiedenen Spezies beschrieben wurde, kommt die Aufgabe der Abgrenzung der Neuropile im Insektengehirn untereinander, die Vernetzung der einzelnen Neuropile durch Gliapodien und die Versorgung der Neurone, wie auch dem Recycling der Neurotransmitter aus dem synaptischen Spalt zu. Zudem sind die Neuropilgliazellen,

wie der Name schon sagt, maßgeblich am Aufbau der Neuropile während der embryonalen Entwicklung des Gehirns beteiligt.

Zusätzlich charakterisiert die Expression des Enzyms Glutaminsynthetase verschiedene morphologische Unterarten von Gliazellen, die in unterschiedliche Module des Mittelhirns projizieren (Abbildung 4.8). Dies entspricht den beschriebenen Zellen, im Hinblick darauf, dass diese Gliazellen morphologisch astrozytenähnliche Zellen sind, ähnlich den Zellen, welche im adulten Mittelhirn bei *Drosophila* beschrieben sind (Awasiaki et al., 2008), basierend auf der nachgewiesenen Expression von Glutaminsynthetase in astrozytenähnlichen Gliazellen in Gehirnen bei *Crustacea* (Harzsch und Hansson 2008) und Astrocyten des Vertebratengehirns (Martinez-Hernandez et al., 1977; Ward et al., 2004; van der Hel et al., 2005).

### **5.2 Interaktion zwischen Gliazellen und Neurone während der Entwicklung des ZNS**

Die Frage der Hierarchie zwischen Neurone und Gliazellen bei der Organisation der Neuropile scheint analog ihrer Einsatzorte zu variieren. Im Bauchmark migrieren Gliazellen zu ihren stereotypischen Bestimmungsorten in der Mittellinie. Dort fungieren sie als Wegweiser für wachsende Axone, deren Wachstumskegel einem zuvor angelegten Gliagerüst folgen (Bastiani und Goodman 1986; Jacobs und Goodman 1989; Noordermeer et al., 1998; Hidalgo und Booth 2000; Klämbt 2009). Diese Gliazellen werden durch Gene wie *single minded* (Crews et al., 1988; Thomas et al., 1988), *glia cells missing* (Hidalgo und Booth 2000) und den epidermal growth factor receptor pathway (Zak et al., 1990; Scholz et al. 1997) reguliert. Die Gliazellen umwickeln und umhüllen danach die axonalen Prozesse. Bei Abwesenheit des Proteins Wrapper umhüllen die Gliazellen die Axone nicht, was zu deren Tod führt, mit dem Ergebnis, dass die Faserkommissuren sich nicht normal teilen (Noordermeer et al., 1998). Bei Abwesenheit des Gens *glia cells missing* werden in der Peripherie die lateralen Gliazellen in Neurone transformiert (Hosoya et al., 1995; Jones et al., 1995). Im sich entwickelnden Auge migrieren retinale basale Gliazellen von Neuronen in die Augenscheibe und regulieren anschließend die Führung der

Axone der Photorezeptoren, allerdings nicht deren Auswachsen (Rangarajan et al., 1999; Silies et al., 2007).

Dass Gliazellen eine wichtige Rolle in der Festlegung des Musters der Axonprojektionen spielen wird deutlich, wenn man sich verschiedenen Mutanten genauer betrachtet. So kommt es im Bauchmark zu einer Fehlsteuerung der Faszikulation wie am Beispiel des Phänotyps der *karussell* Mutante zu erkennen ist. In dieser Mutante kommt es zu einem kreisförmigen switching der Axone zwischen der anterioren und der posterioren Kommissur. In *Drosophila* kommt es bei Mutationen der Gene der *pointed* group zu einer Fehlstellung der Gliazellen der Mittellinie (Hummel et al., 1999a,b). Solche genetischen Ablationen der Gliazellen der Mittellinie führen zu einem neuronalen Verlust und zu Defekten in der neuronalen Verschaltung (Booth et al., 2000; Hidalgo und Booth, 2000; Klämbt, 2009). Obgleich die Kreuzung der Axone in der cerebralen Mittellinie nicht identisch ist, zeigen Mutationsanalysen fehlregulierte Phänotypen wie *karussell* (Abbildung 5.1a, b), einen Einblick in die Rolle der Gliazellen bei der Generierung der Chiasmata des Zentralkomplexes (Boyan et al., 2014).

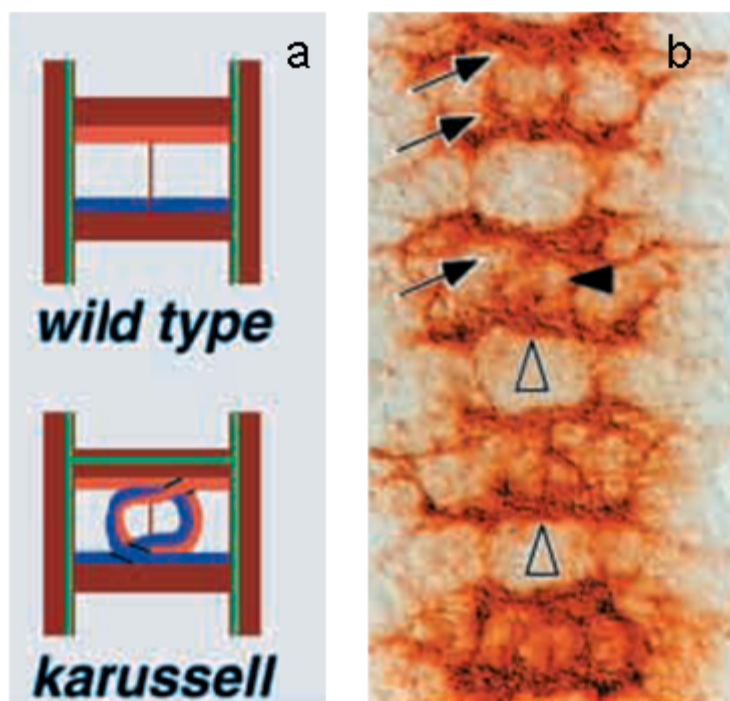


Abbildung 5.1: Der *karussell* Phänotyp.

Quelle: Hummel et al. (1999). Development 126, 771-779 (modifiziert)

### Erklärung zu Abbildung 5.1:

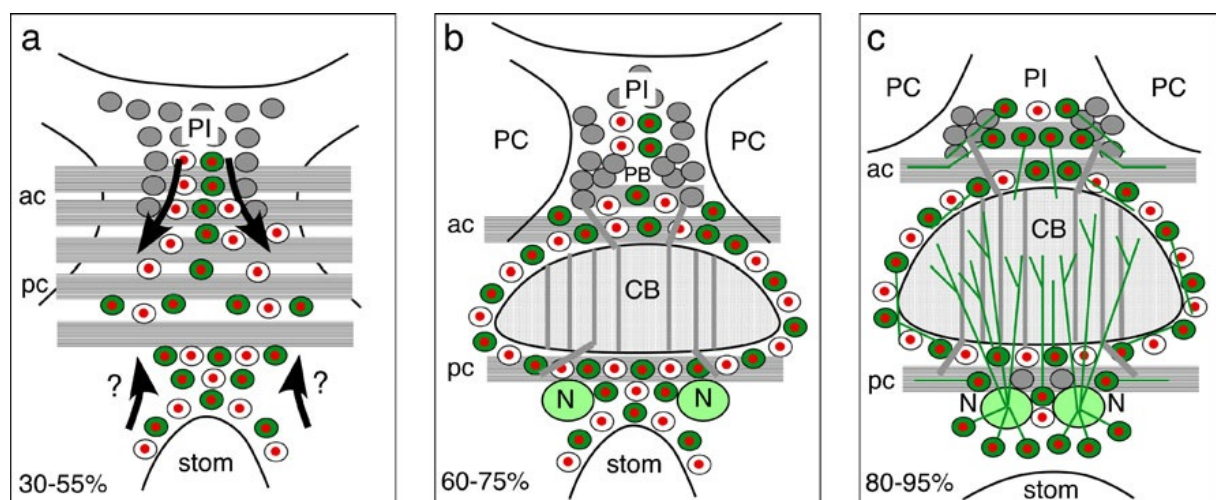
Frontale Ansicht eines seziierten Zentralnervensystems. **a:** Schematische Darstellung des Phänotyps des Wildtyps und des *karussell* Axonmusters. In rot und blau sind die Kommissurfasern, in grün die Longitudinalfasern dargestellt. **b:** Entwicklung des axonalen ZNS Musters in Embryonen der *karussell* Mutante. In stage 13 Embryonen haben sich die Kommissuren wie in Wildtyp Embryonen getrennt. Jedoch erscheinen die PR1 Neurone (schwarze Pfeilspitzen) näher an der Mittellinie. Ein auffälliger Ring an Axonen umrundet die RP1 Zellkörper. Die Kommissuren scheinen dicker an der Mittellinie (Pfeile). Die weißen Pfeilspitzen deuten auf die Prozesse der VUM Mittellinienneurone.

Somit könnten Gliazellen bei der Bildung der säulenförmigen Neuroarchitektur des Zentralkomplexes eine wichtige Rolle spielen. Wie in der Mittellinie des Bauchmarks könnten Gliazellen im Zentralkomplex der Heuschrecke als Kontrollposten dienen, um zu entscheiden ob die Neurone Defaszikulieren und das fascicle switching einleiten oder nicht. Im Bauchmark bei *Drosophila* verhindern Gliazellen Axone die Mittellinie mehr als einmal zu kreuzen und sichern somit, dass ipsilaterale Axonprojektionen nicht mehr über die Mittellinie zurück kreuzen (Hummel et al., 1999). Dies könnte auch eine der Aufgaben der Gliazellen des Zentralkomplexes in der Heuschrecke bei fascicle switching sein, und somit den Neuronen die mögliche Information der choice points liefern.

Wie schon erwähnt spielen Gliazellen bei der Festlegung des Musters der Axonprojektionen eine Rolle. Nicht nur im Bauchmark der Insekten wird die Organisation der Neurone durch Gliazellen organisiert. So findet man auch eine chiasmatische Ordnung in den optischen Loben. Die Genauigkeit der säulenförmigen Organisation der Chiasmata der optischen Loben hängt von der Positionierung der so genannten giant chiasm glia ab (Tix et al., 1997). In dem sich entwickelnden Augen, migrieren retinale basale Gliazellen unabhängig von Neuronen in die Augenscheibe und regulieren anschließend die Axonführung der Photorezeptoren (Rangarajan et al., 1999; Silies et al., 2007).

Im Gegensatz dazu wurde im Gehirn in *Manduca* gezeigt, dass die Verteilungen der Gliazellen, welche mit den sich entwickelnden Glomeruli der Antennenloben assoziiert sind, durch einwachsende sensorische Axone initiiert werden (Oland und Tolbert 1987, 1989; Oland et al., 1999). Die Entfernung der sensorischen Axone führt zu einer fehlerhaften Verteilung der Gliazellen und zu missgebildeten Glomeruli. Bei

*Drosophila* senden Gliaabkömmlinge des Typs II der Zelllinie des Zentralkomplexes Prozesse hinein, und migrieren daran entlang und formen im Vorfeld axonale Prozesse von ihren neuronalen Entstehungsorten (Izergina et al., 2009). Die Repo-positiven/GS-negativen Gliazellen der protocerebralen Mittelhirnregion bei *Schistocerca gregaria* wandern während der Embryogenese stufenweise von ihrem Entstehungsort in diese Region ein (Abbildung 4.5). Anschließend dringen diese Zellen in die Faszikel des anterioren und posterioren Kommissurensystems ein, wie bereits für die Neuomere des Bauchmarks bei *Drosophila* berichtet (Klämbt et al., 1991; Noordermeer et al., 1998; Page 2004; Klämbt 2009). Davor richten sie sich selbst aus und umrunden anschließend das sich entwickelnde Mittelhirnneuropil (Vanhems 1985; Hähnlein und Bicker 1996, 1997). Die diskutierten Ergebnisse sind in Abbildung 5.2 schematisch dargestellt.



**Abbildung 5.2: Schematische Darstellung der Organisation der Gliazellen anhand drei unterschiedlicher embryonaler Entwicklungsstadien.**

Quelle: Boyan, Losser, Williams, Liu (2011). Dev. Genes Evol. 221, 141-155

#### Erklärung zu Abbildung 5.2:

Die grauen Zellen repräsentieren Neurone. Alle kortikal exprimierenden GS-positiven Gliazellen (dunkelgrün) sind gleichzeitig Repo-positive im Zellkern exprimierende Gliazellen (rot). Jedoch müssen Repo-positive Gliazellen nicht zwangsläufig GS-positiv sein.

**a** Zeigt einen embryonalen Entwicklungsstand zwischen 30-55%. Nur die Faserkommissuren, die im Mittelhirn anzutreffen sind, gehören zum anterioren, bzw. posterioren kommissuralen System. Der Zentralkörper hat sich bei diesem embryonalen Entwicklungsstand noch nicht gebildet. Das Verteilungsmuster der Gliazellen weist darauf hin, dass die Gliazellen aus der Pars intercerebralis in das kommissurale System migrieren und möglicherweise auch die Region um das Stomodaeum bilden. **b** Bei einem embryonalen Entwicklungsstand zwischen 60-75% beginnt sich das Neuropil des Zentralkörpers zwischen dem anterioren und posterioren kommissuralen System zu bilden. Die

kolumnäre Neuroarchitektur des Zentralkörpers beginnt sich durch axonale Projektionen neuronaler Cluster in der Pars intercerebralis zu generieren. Gliazellen umrunden nun den Zentralkörper. Es sind noch keine Gliaprojektionen innerhalb des Zentralkörpers vorhanden. Die Noduli (hellgrün) weisen eine intensive Glutaminsynthetase-Färbung auf. **c** Bei einem embryonalen Entwicklungsstand zwischen 80-95% sind beträchtliche Gliaprojektionen der GS-positiven Gliazellen, sowohl innerhalb des Zentralkörpers um den Zentralkörper wie auch in den Faserkommissuren, zu erkennen. In den Noduli sind besonders viele Gliaprojektionen auszumachen.

### **Abkürzungen in Abbildung 5.2:**

ac anteriore Kommissur. CB Zentralkörper. N Noduli. PC Protocerebrum. pc posteriore Kommissur. PI Pars intercerebralis. stom Stomodaeum.

Das Verteilungsmuster der Gliazellen deutet darauf hin, dass die Gliazellen, die in sich entwickelnde Kommissuren migrieren, nicht nur aus der Pars intercerebralis stammen, sondern auch aus der Region um das Stomodaeum (Abbildung 5.2a). Das Expressionsmuster der Glutaminsynthetasefärbung zeigt, dass die Gliazellen ihre Projektionen nicht ausbilden bevor sich die Neuroarchitektur des Zentralkörpers ausgebildet hat (Abbildung 5.2b, c). Daher haben die neuronalen Komponenten Vorrang. In der Tat findet der Prozess des fascicle Switching, welcher für die kolumnäre Organisation des Zentralkörpers verantwortlich ist (Boyan et al., 2008) unabhängig von den Gliazellen statt.

Einmal gebildet haben die Gliaprojektionen innerhalb des Zentralkörpers eine kolumnäre Organisation (Abbildung 4.8 und 5.2c) und es scheint, dass sie sich der neuronalen Säulenarchitektur anpassen. Auch eine Interaktion mit dem Tracheensystem (Hoyle 1986; Cantera und Trujillo-Cenoz 1996) wäre plausibel und charakteristisch für astrozytenähnliche Zellen, welche bei Vertebraten eine essentielle Verbindung zwischen dem Nervensystem und dem Vascularsystem bilden (Bear et al., 2007).

Die hier beschriebene Rolle des Zentralkomplexes als ein Verarbeitungszentrum für visuelle Information und Gedächtnis in neuzeitlichen Insekten (Vitzthum et al., 2002; Liu et al., 2006; Heinze und Homberg, 2007; Sakura et al., 2008) unterstützt die evolutionären Analysen, welche annimmt, dass diese Gehirnregion ein konserviertes Verarbeitungszentrum für visuelle Prozesse in Panarthropoden zeigen ein Spektrum der Neuroarchitektur: vom arcuate body der chliceraten und onychophorans hin zum

Zentralkomplex der Decapoden Crustaceen und Insekten (Homberg, 2008). Dennoch zeigt die kürzliche Studie des fanshaped body in augenlosen Insekten (Böhm et al., 2012), die über Millionen Jahre blind waren, und trotzdem eine säulenartige Neuroarchitektur mit kompletter Kreuzung der Axone, die Chiasmate bilden, dass anstelle des Sehens wie in der Heuschrecke andere Formen der sensorischen Information die mit Geräuschen, Berührung, Temperatur oder Geruch, und möglicherweise über die Antenne (siehe Bender et al., 2010; Harley and Ritzmann, 2010) eine äquivalente Neuroarchitektur in diesen blinden Insekten hervorbringt.

Diese frühe faszikuläre Organisation spiegelt die Organisation im embryonalen Bauchmark wieder, wo Repo-, Castor- und Sim-positive Gliazellen, welche durch *single minded* (Crews et al., 1988; Thomas et al., 1988), *glia cells missing* (Hidalgo und Booth, 2000) und dem epidermal growth factor Rezeptor (EGFR) signaling pathway (Zak et al., 1990; Scholz et al., 1997) reguliert werden, zu stereotypischen Stellen der Mittellinie migrieren und Wegweiser für einwachsende Axone stellen, deren Wachstumskegel auf ein Gliagerüst treffen (Bastiani und Goodman, 1986; Jacobs und Goodman, 1989; Noordermeer et al., 1998; Hidalgo und Booth, 2000; Sedaghat und Sonnenfeld, 2002; Klämbt, 2009).

In Insekten bildet die Kreuzung der Axone die Säulen des Zentralkörpers; in Crustaceen ebenso die Säulen des Zentralkörpers; in Onychophoren, Cheliceraten und Chilopoden die Säulen des Arcuatekörpers (siehe Strausfeld, 2012). In Diplopoden ist keine hochorganisierte Neuropilstruktur zu erkennen.

Vergleichende Daten weisen darauf hin, dass die Kreuzung der Axone an stereotypischen Positionen entlang der Querachse eine konservierte neuroarchitektonische Eigenschaft der adulten preoralen Mittellinie der Panarthropoda ist (Boyan et al., 2014). Dies ist unabhängig davon ob die Neurone durch einzelne Vorläuferzellen oder aber durch Zellcluster gebildet werden, und ab welchem Entwicklungsstand dieser Prozess auftritt. In hemimetabolen Insekten wie der Heuschrecke wird dieses Programm nach der Midembryogenese (Boyan et al., 2008) ausgeführt, in holometabolen Insekten postembryonal, bei Käfern während der Larvenentwicklung (Wegerhoff und Breidbach, 1992) oder sogar noch später während des Puppenstadiums wie in *Drosophila* (Renn et al., 1999; Young and Armstrong, 2010a,b).



### 5.3 Zellkopplung und gap junctions

Die Gliazellen des Nervensystems der Invertebraten sind bei der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt (Schofield et al., 1984; Swales und Lane 1985; Carlson und Saint Marie 1990; Carlson et al., 2000; Peraanu et al., 2005; Banerjee und Bhat 2007), haben phagozytotische Funktion (Doherty et al., 2009) und sind in die Prozesse der synaptischen Transmission, z.B. über  $K^+$  und  $Ca^{2+}$  Signal Wege (Schmidt und Deitmar 1996; Edwards und Meinertzhagen 2010; Koussa et al., 2010) einbezogen. Die Interaktion zwischen Gliazellen und Neuronen ist ebenfalls ein integraler Bestandteil bei der Entwicklung des Nervensystems der Insekten. Gliazellen sind eine Quelle für sekretierte Wegweiser der neuronalen Navigation und Differentiation (siehe Silies und Klämbt 2011). Sie umhüllen die Axone (Noordermeer et al., 1998), spielen eine Rolle in der Organisation der Kommissuren des ventralen Bauchmarks (Tiemeyer und Goodman 1996; Page 2004) und können, als Konsequenz ihrer eigenen, sekundären Effekte, auf die Entwicklung der Neurone einwirken (Bastiani und Goodman 1986; Jacobs und Goodman 1989; Fredieu und Mahowald 1989; Copenhaver 1993; Hidalgo und Booth 2000; Sepp und Auld 2003; Klämbt 2009; Silies und Klämbt 2011).

Der Zentralkomplex der Heuschrecken ist zum Zeitpunkt des Schlüpfens funktionsfähig. Auch wenn Interaktionen zwischen Gliazellen oder Interaktionen zwischen Gliazellen und Neuronen noch nicht vollständig etabliert sein müssen, hat dennoch schon eine erhebliche Reifung während der Entwicklung stattgefunden (siehe Boyan und Reichert 2011). Vor der Bildung des Zentralkomplexes der Heuschrecke wurden Gliazellen zunächst in der Pars intercerebralis gefunden, wo sie sich zwischen den Faserkommissuren des Mittelhirns der Heuschrecke verteilen (Abbildung 4.3a). Sobald sich der Zentralkomplex etabliert, migrieren diese Gliazellen um den Zentralkomplex und umhüllen die entstehende Neuroarchitektur (Abbildung 4.2i; 4.3c), wie zuvor auch für die Mittellinienneuropile des Hirns bei einer großen Spanne unterschiedlicher Spezies berichtet wurde (Nordlander und Edwards 1969; Vanhems 1985; Ito et al., 1994; Hähnlein und Bicker 1996, 1997; Hartenstein et al., 1998; Peraanu et al., 2005; Boyan et al., 2011). Die Migration der Gliazellen im zentralen und peripheren Nervensystem der Insekten ist sowohl von den Interaktionen zwischen Neuronen und Gliazellen als auch von den Interaktionen zwischen Gliazellen untereinander abhängig (Rangarajaram et al., 1999; Silies et al.,

2007; Klämbt 2009; Silies und Klämbt 2011). Unter den Faktoren, die bei der Interaktion zwischen Gliazellen, sowohl im Nervensystem der Insekten (Koussa et al., 2010) als auch im Nervensystem der Vertebraten (Parys et al., 2010), eine Rolle spielen, ist der  $\text{Ca}^{2+}$  Signalweg via gap junctions. Ein Indikator für die gap junctions Kommunikation ist die Anwesenheit von Zellkopplungen, wie durch fluoreszierende Farbstoffe gezeigt wurde (Hossain et al., 1995; Ball et al., 2007; Lanosa et al., 2008; Koussa et al., 2010).

Es ist bekannt, dass Gliazellen bei Vertebraten über gap junctions kommunizieren (Zahs und Newman 1997; Newman 2001; Rela et al., 2010). So ergibt sich ein zelluläres Netzwerk, welches nur Astrozyten (Theiss und Meller 2002; Houades et al., 2008; Tanaka et al., 2008), Astrozyten und Oligodentrozyten (Parys et al., 2010) oder Astrozyten und Neurone (Hatton 2002; Schummers et al., 2008) beinhaltet. Bei Invertebraten wurde die Kommunikation via gap junctions zwischen Neuronen (Wilcox 1994; Alexopolous et al., 2004; Dykes et al., 2004; Ducret et al., 2006) und zwischen Gliazellen (Swales und Lane 1985; Schmidt und Deitmar 1996; Edwards und Meinertzhagen 2010) verschiedener Spezies, und auf der Basis elektronischer Kopplung in identifizierten Neuronalen Netzwerken wie z.B. dem große Fasersystem bei *Drosophila*, untersucht (Phelan et al., 2008). Die Entwicklung der Kommunikation über gap junctions, speziell zwischen Gliazellen, wurde im ventralen Bauchmark der embryonalen Heuschrecke erforscht (Swales und Lane 1985). Erst in der zweiten Hälfte der Embryogenese werden gap junctions, tight junctions und septate junctions, die aus der lateralen Migration sogenannter intermembranöser Partikel resultieren, in Gliazellen eingebaut (Swales und Lane 1985). Die Etablierung des resultierenden zellulären Glianetzwerks stimmt temporär mit der beginnenden Alterung elektrischer Eigenschaften (Goodman et al., 1979; Goodman und Spitzer 1981) und mit Transmittersystemen (Goodman et al., 1979; Goodman und Spitzer 1980) in den Zelllinien der Neuronen, mit denen die Gliazellen interagieren, überein. Interessanterweise werden in denselben Zelllinien, allerdings zu einem früheren Zeitpunkt der Embryogenese, elektrische Interaktionen über die Kommunikation via gap junctions vermittelt (Goodman et al., 1979; Goodman und Spitzer 1981).

Im Gehirn wurde Zellkopplung in embryonalen Zelllinien, die den Zentralkomplex generieren, sowohl mit interzellulären Markern als auch mit extrazellulären Markern, gezeigt: Dies wurde in Wholemout-Präparaten, unfixierten embryonalen Gehirnen

(Ludwig et al., 1999; Boyan et al., 2008), in fixierten, in Agarose eingebetteten Hirnschnitten (Boyan et al., 2011), und in unfixierten, gefrorenen Hirnschnitten (Abbildung 4.10 und 4.13) durchgeführt. Die Prävention des Dye Couplings kann sowohl in gefrorenem, als auch in ungefrorenem Gewebe über den anerkannten gap junctional Blocker *n*-Heptanol (Burt und Spray 1980; Weingart und Bukauskas 1998; Juszczak und Swiergiel 2009; Chapman et al., 2010) induziert werden (Abbildung 4.15). Anders als die segmentalen großen neuropilen Gliazellen im Blutege (Schmidt und Deitmar 1996), sind in dieser Arbeit die Gliazellen, die mit dem Zentralkörper assoziiert sind, nicht individuell identifizierbar. Auch wenn entsprechende Zellen in verschiedenen Präparaten auftauchen, ist es nicht möglich diese einzelnen Zellen wiederzuerkennen. Dementsprechend wurde bei jeder Injektion und auch bei jedem Experiment, mit größtmöglicher Sicherheit, in eine individuelle Zelle an den vier verschiedenen Injektionspunkten injiziert. Nichtsdestotrotz ist das Muster und die Anzahl der gekoppelten Zellen für jeden der Injektionspunkte, bei 70%iger und 100%iger Embryogenese, so gleichartig (Abbildung 4.10 und 4.13) und für jeden getesteten Injektionspunkt dennoch individuell so unterschiedlich, dass das Muster der Zellkopplung, unabhängig vom embryonalen Entwicklungsstand, sich mit den Regionen um den Zentralkörper decken. Daraus kann man schließen, dass sobald die migrierende Gliazelle ihren jeweiligen Bestimmungsort um den Zentralkörper eingenommen hat, das Netzwerk der Verbindungsstellen, das die Gliazellen etablieren, während der weiteren Entwicklung bestehen bleibt.

Ein Vergleich der 3D-Rekonstruktionen, die die Zellkopplung der gesamten Zellpopulation an den jeweiligen Injektionsstellen in unterschiedlichen Präparaten zeigen, macht deutlich, dass die meisten Zellen untereinander gekoppelt sind (Abbildung 4.12). Dass das Neuropil des Zentralkörpers komplett von gekoppelten Zellen umhüllt ist, zeigt die Überlagerung der Färbungen der gesamten Injektionspunkte (Abbildung 4.11a, b). Es ist jedoch noch unklar, ob diese Zellen ein einheitliches Netzwerk bilden. Obwohl die Daten mit der Existenz der gap junctions Kommunikation zwischen den Gliazellen des Zentralkomplexes übereinstimmen, wird eine molekulare oder elektronenmikroskopische Bestätigung von Nöten sein, da z.B. im visuellen System der Fliege gezeigt wurde, dass nicht alle gap junctions in elektrisch gekoppelten Zellen gleichzeitig ein Dye Coupling zulassen. (Wilcox 1994).

## 5.4 Gliapodien und Zellkopplung während der Entwicklung

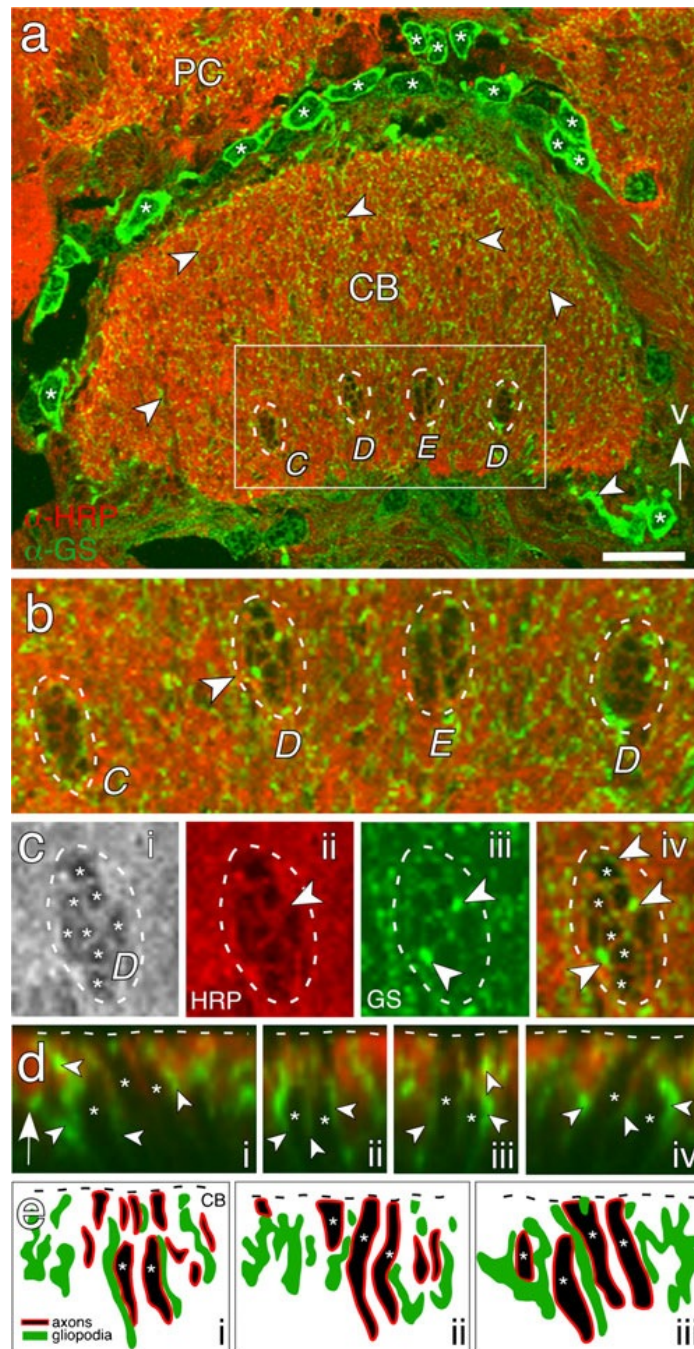
Die Tatsache, dass die mit dem Zentralkomplex assoziierten Gliazellen nicht über einen direkten Kontakt der Zellkörper verbunden sein müssen um eine Zellkopplung zu gewährleisten (Abbildung 4.10), deutet darauf hin, dass sobald gap junctions dafür zuständig sind, dies sowohl auf das Soma wie auch auf Gliapodien zurückzuführen ist. Betrachtet man die Region um den sich entwickelnden Zentralkomplex beim Entwicklungsstand zwischen 60% und 70% (Abbildung 4.3), so zeigt sich, dass zu diesem Zeitpunkt nur sehr wenige der Repo-positiven/GS-positiven (astrozytenähnlichen) Gliazellen Gliapodien gebildet haben (Abbildung 4.16a). Demzufolge müssen diese Gliazellen als große nackte Somata zu ihrem Bestimmungsort migrieren. Übereinstimmend mit diesem anatomischen Befund ist die Erfolgsrate der Zellkopplungsergebnisse der Mikroelektrodenexperimente (Tabelle 4.1) bei 70%igem Entwicklungsstand geringer als bei weiter entwickelten Gehirnen. Bei 80%iger Embryogenese sind die Fortsätze der Gliapodien und deren Ausdehnung deutlich angewachsen (Abbildung 4.16b). Mit der Annahme, dass die gap junctions der Gliazellen des Mittelhirns bei 70%iger Embryogenese voll funktionsfähig sind, wie es bei den Gliazellen des Bauchmarks der Fall ist, kann man davon ausgehen, dass, bei den erfolgreichen Injektionen im Embryonalstadium bei 70% die, Gliapodien ausreichend ausgebildet waren um den Effekt des Dye Couplings auszuführen.

Am Ende der Embryogenese haben sich die Gliapodien der astrozytenähnlichen Gliazellen flächendeckend um das Neuropil des Zentralkörpers verzweigt (Abbildung 4.16c). Dieses Muster bleibt dann durch die einzelnen postembryonalen Stadien erhalten (Abbildung 4.16d). Betrachtet man den Zentralkörper, so erkennt man, dass die Gliapodien auf das stereotypische Muster des kolumnären Fasersystems projizieren (Williams 1975; Heinze und Homberg 2008; el Jundi et al., 2010; Boyan und Reichert 2011; Boyan et al., 2011). Dort sind die Gliazellen mit den Axonen der W, X, Y, Z Neuronen assoziiert und nehmen eine umhüllende Funktion ein. Im Modellsystem *Drosophila* wurde erforscht, dass es durch genetische Ablation der embryonalen Gliazellen zu einer neuronalen Schädigung kommt, und ein Defekt in der neuronalen Verschaltung entsteht (Booth et al., 2000; Hidalgo und Booth 2000). Des Weiteren wurde bei Ablationsexperimenten in den Antennenloben bei *Manduca* gezeigt, dass die Organisation der Glomeruli von den Interaktionen zwischen

Neuriten und migrierenden Gliazellen abhängt (Oland und Tolbert 1987, 1989; Oland et al., 1999). Bei den Gliapodien, die von den Gliazellen der Mittellinie generiert werden, kontaktieren Neurite. Durch fehlerhafte Expression von Rac1n17 in diesen Gliazellen werden die Gliapodien herunterreguliert um dadurch die Position des Neuropils der Mittellinie im Bauchmark bei *Drosophila* zu verändern (Vasenkova et al., 2006). Es ist faszinierend, dass die Gliazellen des embryonalen zellulären Netzwerks in der Heuschrecke, wie auch in *Drosophila*, die mit dem Zentralkomplex assoziiert sind, als stereotaktisches Positionierungssystem agieren. Sie regulieren dadurch die Position und die Größe der Neuropile und repräsentieren somit eines der Elemente der Anpassung dieses Netzwerks für das postembryonale Leben der Tiere (Stevenson und Kutsch 1986).

### 5.5 Postembryonale Reifung des Zentralkomplexes

Da sich der Zentralkomplex bei *Schistocerca gregaria* im Laufe der Embryogenese entwickelt, sind die Strukturen des Zentralkomplexes nach dem Schlüpfen der Tiere dem Zentralkomplex adulter Tiere bereits sehr ähnlich (Boyan und Williams 1997; Williams et al., 2005). Vorausgehend der Entwicklung des Zentralkomplexes formen Gliazellen eine anhaltende Population, welche sich von der Pars intercerebralis in die Region der Faserbündel ausdehnt. Nach der Hälfte der Entwicklung verteilen sich diese Gliazellen um die einzelnen Module des Zentralkomplexes zu umhüllen. Während keine Gliazellkörper (Somata) in den Neuropilen des Zentralkomplexes zu finden sind, zeigen Rekonstruktionen einzelner Gliazellen Prozesse eines Typs glutaminsynthetase-positiver Gliazellen, die den Zentralkomplex umhüllen, während ein zweiter Typ beträchtliche säulenartige Verzweigungen in den Zentralkomplex sendet. Solche Verzweigungen sind nur in den Modulen des Zentralkomplexes, nachdem die Neuroarchitektur fertig gestellt ist, zu sehen. Annehmend, dass die Verzweigungen der Gliazellen entlang einem vorausgehenden Gerüst aus Nervenfasern und/oder Tracheen projizieren.



**Abbildung 5.3:** Gliapodien dringen in die säulenartigen Faserbündeln innerhalb des Zentralkörpers des w, x, y, z, Traktsystems ein.

Quelle: Boyan, Williams, Götz (2013) Cell Tissue Res. 351 (3): 361-72

#### Erklärung zu Abbildung 5.3:

**a:** Konfokale Aufnahme eines Horizontalschnittes durch das adulte Gehirn von *Schistocerca gregaria* auf Höhe des Zentralkörpers nach erfolgter Doppelfärbung mit anti- Glutaminyl synthetase (GS, grün) und anti-Meerrettichperoxidase (HRP, rot). GS-positive/HRP-negative astrozytenähnliche Gliazellen (weiße Sterne) umrunden den Zentralkörper und senden Gliapodien (weiße Pfeilspitzen) in dessen Neuropil. Vier anteriore/posterior verlaufende Axonbündel (gestrichelte weiße Linie) sind in regulären Intervallen im dorsalen Zentralkörper angeordnet. Diese Axonbündel (C, D, E, D) sind Subsets die in

Abbildung X rekonstruiert dargestellt sind (weißer Kasten wird in höherer Auflösung in **b** dargestellt). **b**: Konfokale Aufnahme der Region (weißer Kasten) in **a** zeigt die reguläre Anordnung der Axonbündel (C, D, E, D). Jedes Axonbündel wird durch eine gestrichelte weiße Linie begrenzt und von Gliapodien (grün) der GS-positiven astrozytenähnlichen Gliazellen umrundet. Auch innerhalb der Faserbündel erscheinen Gliapodien (weiße Pfeilspitzen in **c** in höherer Auflösung dargestellt). **c**: Konfokale Aufnahme des D Faserbündels ( gestrichelte weiße Linie) aus **b**. **ci**: Zeigt das Axonprofil (weiße Sterne) mit eigenständigen Faserbündeln. **cii**: Der Rote Kanal zeigt Axone (weiße Pfeilspitzen) innerhalb der Faserbündel die HRP-positiv sind. **ciii**: Der grüne Kanal zeigt GS-positive Gliapodien (weiße Pfeilspitzen), welche die Faserbündel infiltrieren. **civ**: Die Kombination des roten und grünen Kanals zeigt GS-positive Gliapodien (weiße Pfeilspitzen), die zwischen den HRP-positiven Axonprofilen (weiße Sterne) innerhalb der Faserbündel verflochten sind. **d**: Konfokale Abbildung von vier verschiedenen Säulen (i-iv) des w, x, y, z Systems innerhalb der Zentralkörpers nach erfolgter Doppelfärbung gegen HRP (rot) und GS (grün). Z Stacks des Zentralkörpers wurden rotiert und optisch geschnitten um eine interne Seitenansicht jeder Säule zu gewährleisten. Prozesse GS-positiver Gliazellen (weiße Pfeilspitzen) sind in unmittelbarer Lage zu den HRP-positiven Axonen (weiße Sterne) zu finden. Die ventrale Oberfläche des Zentralkörpers ist durch eine gestrichelte weiße Linie gekennzeichnet. **e**: Darstellungen basierend auf den rotierten optisch geschnittenen konfokalen Z Stacks zeigen die Verteilung der Gliaprozesse (grün) innerhalb des Zentralkörper. Einige sind dichter mit den HRP- positiven (rot) Axonen (schwarz, weiße Sterne) innerhalb des w, x, y, z Systems assoziiert. Die ventrale Oberfläche des Zentralkörpers ist durch gestrichelte schwarze Linie dargestellt. Pfeil in a zeigt nach ventral. Maßstab in a repräsentiert 55 µm, in b 27 µm, in c 21 µm und 17 µm in d und e.

### Abkürzungen in Abbildung 5.3:

CB Zentralkörper. GS Glutaminsynthetase. HRP Meerrettichperoxidase. PC Protocerebrum.

Die astrozytenähnlichen Gliazellen, welche in Assoziation mit dem Zentralkörper stehen beginnen mit der Ausbildung ihrer Projektionen ab einem Embryonalstadium von 70% (Abbildung 4.16), und projizieren diese auf ein bereits vorhandenes Axongerüst. Dies geht mit der Umlagerung der Gliazellen einher, die ihre Position im Laufe der Embryogenese bei einem Entwicklungsstand zwischen 60% und 75% einnehmen und beginnen das Neuropil des Zentralkomplexes zu formen und einzugrenzen (Abbildung 5.2) Betrachtet man den embryonalen Entwicklungsstand bei 100%iger Embryogenese, haben die Gliazellen ihre Position um den Zentralkörper eingenommen und begonnen die Gliapodien sowohl um das Neuropil, als auch in dieses hinein zu senden (Abbildung 5.3a). Im Laufe der Postembryonalentwicklung verdichtet sich das Netzwerk der Glutaminsynthetase-positiven Zellen. Die einzelnen Zellen verdichten und verästeln sich mehr und mehr.

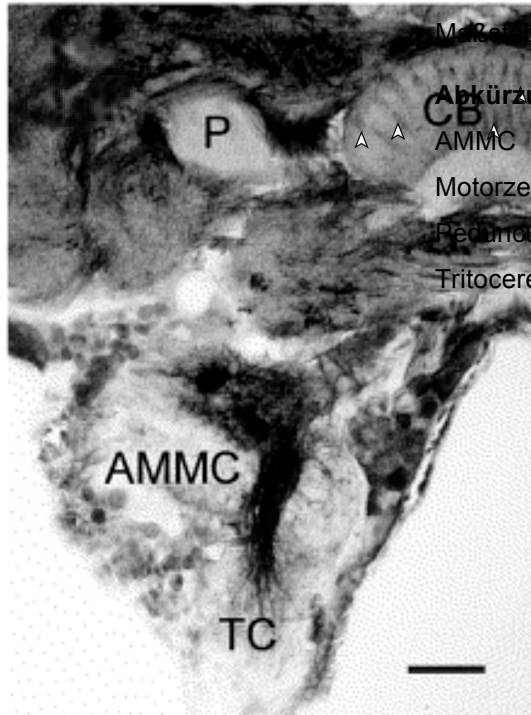
Im adulten Gehirn der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* bildet sich ein engmaschiges Geflecht der Gliaprojektionen. Diese bilden durch Überlagerung der Projektionen ein Gliapil (Abbildung 5.3a).

Wie bereits in der Einleitung geschildert konnte Awasaki et al. (2008) zeigen, dass es zwei Untergruppen an Neuropilgliazellen gibt, wobei der eine Typ Gliazelle dicht am Neuropil liegt und es nach außen hin abgrenzt (Abbildung 5.3a) und der zweite Typ Gliazellen seine Projektionen in das Neuropil erstreckt und infiltriert. Diese Gliazellprojektionen dringen dann, sobald sie ihr Gliapil ausgebildet haben, in die säulenartigen Faserbündel innerhalb des Zentralkörpers ein und umrunden diese Faserbündel (Abbildung 5.3c-e).

Ähnlich der Reifung der Gliapodien verhält es sich auch mit den Neuromodulatorischen Substanzen im Zentralkörper von *Schistocerca gregaria*. So sind Substanzen, die als Neuromodulator dienen, im adulten Heuschreckengehirn vorhanden, zu einem bestimmten Zeitpunkt der Embryonalentwicklung allerdings nicht - bzw. noch nicht - existent (Herbert et al., 2010). Betrachtet man die Expression der Neuromodulatorischen Substanzen speziell im Zentralkörper der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* erkennt man, dass Allatostatin, welches für die Ausbildung der Haut- und Augenpigmente und zur Lichtadaptation schon bei einem embryonalen Entwicklungsstand von 60%, und Lokustatachykinin, welches für die Muskelkontraktion und die Ausbildung der Darmmuskulatur zuständig ist, ab einem embryonalen Entwicklungsstand von 70% im Zentralkörper exprimiert werden. Der Neurotransmitter Serotonin tritt im Zentralkörper ab einem embryonalen Entwicklungsstand von 80% auf.

Es scheint, dass sich die Expression neuroaktiver Substanzen im Zentralkomplex der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* mit der Etablierung seiner chiasmalen säulenartigen Neuroarchitektur gemeinsam ausbildet, und eine Koexistenz der Gliazellen und der Neurone das adulte Gehirn von *Schistocerca gregaria* erst möglich machen.





### Abkürzungen in Abbildung 5.4:

AMMC antennales mechanosensorischen Motorzentrum. CB Zentralkörper. P Pedunculus der Pilzkörper. TC Tritocerebrum.

**Abbildung 5.4: Glutaminimmunreaktivität im adulten Mittelhirn von *Schistocerca gregaria*.**

Quelle: Homberg (2002). Microscopy Research And Technique 56:189–209 (modifiziert)

Da Glutamat einer der grundlegendsten Neurotransmitter der Insekten ist (Homberg 2002), und somit unter Anderem für die Motorik verantwortlich ist, ist dieser im adulten Heuschreckengehirn massiv verbreitet (Abbildung 5.4). Da die Larven von *Schistocerca gregaria* als „vereinfachte“ Imagos aus dem Ei schlüpfen (Boyan und Ball, 1993; Seidel und Bicker, 2002; Williams et al., 2005), und somit Bewegungsfähig sind, muss sich im Laufe der Embryonalentwicklung im Zentralkörper ein Netzwerk glutaminerger Zellen ausbilden. Dies scheint im Falle von *Schistocerca gregaria* bei einem Entwicklungsstand von 70% einzusetzen (Abbildung 4.2b) da sich die säulenartige Neuroarchitektur des Zentralkomplexes zwischen den anterioren (ac) und den posterioren (pc) Kommissuren gebildet hat und seine Architektur bereits dem adulten Tier (Abbildung 4.2c) ähnelt. Zum selben Zeitpunkt beginnen die Gliazellen ihre Positionen um den Zentralkörper einzunehmen (Abbildung 5.2b). Ab einem embryonalen Entwicklungsstand von 70% beginnen nun diese Gliazellen mit der Ausbildung ihrer Gliapodien (Abbildung 4.16a) und mit der einhergehenden Verbreitung des Enzyms Glutaminsynthetase. Dies spricht für eine Erhöhung des Neurotransmitters Glutamat während der embryonalen Reifung des

Zentralkörpers, da das Geflecht der Gliapodien im Laufe der Embryonalentwicklung stetig verzweigter und dichter wird.

## 6 Ausblick

Eine Frage, deren Beantwortung über den Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit hinausreicht, beschäftigt sich mit der Ontogenese der Gliazellen im Gehirn der Heuschrecke. Zu einem frühen Zeitpunkt der Embryogenese, vor der Entstehung des Zentralkomplexes, begrenzt sich die Population der Gliazellen des protocerebralen Mittelhirns größtenteils auf die Pars intercerebralis. Diese Arbeit konnte im Ansatz zeigen, dass diese Region gliale Vorläufer beinhaltet und daher eine Keimzone für Gliazellen repräsentiert (Vanhems 1985). Es wurde dargelegt, dass die Zelllinien des Zentralkomplexes sowohl Gliazellen als auch Neurone enthalten, und dass Repo-positive Gliastammzellen in solchen Zelllinien präsent sind (Boyan et al., 2010). Übereinstimmend mit den Beobachtungen bei *Drosophila* entstehen diese Gliazellen und Neurone zusammen in denselben Zelllinien (Ito et al., 1994, 1997; Peraanu et al., 2005, 2010; Ito and Awasaki 2008; Izergina et al., 2009) und stammen von spezifischen Vorläuferzellen ab (Viktorin et al., 2011). Es wurde sichtbar, dass differenzierte Gliazellen bei einer Reihe von Insektenpezies eine Mitose durchlaufen und sich daher selbst zu Vorläuferzellen machen (Nordlander and Edwards 1969; Carlson and Saint Marie 1990; Hartenstein et al., 1998; Peraanu et al., 2005; Awasaki et al., 2008; Viktorin et al., 2011). Zukünftige Untersuchungen werden klären müssen, welche Kombinationsmodi die Gliazellen des embryonalen Mittelhirns der Heuschrecke generieren.

Nachdem in dieser Arbeit erstmals der Beweis eines durch gap junctions gekoppelten Netzwerkes von Gliazellen in *Schistocerca gregaria* erbracht wurde, ist es von ganz besonderem Interesse, in welchem Ausmaß die Gliapodien der einzelnen Zelltypen in den Postembryonalstadien und im adulten Tier miteinander in Verbindung stehen, und ob und wie sie miteinander kommunizieren.

Die in dieser Arbeit etablierte Methode zur Untersuchung astrozytenähnlicher Gliazellen ebnet nun den Weg für weitere Untersuchungen der Gliazellen in Insekten, da neben dem universellen Gliamarker Repo, der alle Gliazellen im Gehirn sowie im Bauchmark der Insekten kennzeichnet, dem Gliamarker Wrapper und der hier etablierten Methode des Markierens der Gliazellen durch den Antikörper Glutaminsynthetase noch weitere Untersuchungsmethoden erforscht werden

können, um Gliazellen im Insektengehirn und im Bauchmark, wie Hoyle schon 1986 beschrieben hat, molekular zu kennzeichnen und zu differenzieren.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

a	anterior
ac	anteriore Kommissur
AC VIII	anteriore Kommissur
AL	Antennenloben
AN	Antenne
an	Antennennerv
AxHGL	Axon hillock glia
BPLG	Cluster glialer Vorläuferzellen
BSA	Bovine Serum albumin
Ca	Calyx
CB	Zentralkörper
CbGI	Cell-body Glia
CC	Zentralkomplex
cMB	Calyx der Pilzkörper
Comp Eye	Komplexauge
CY3	Indocarbocyanin 3
d	dorsal
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Deutocerebrum
DIC	Differential Interface Contrast optics
DNpG1	dark neuropil glia

EAAT2	exzitatorischer Aminosäuretransporter
EAAT4	exzitatorischer Aminosäuretransporter
EB	Ellipsoidkörper
EGFR	epidermal growth factor Rezeptor
EthGal	osmium ethyl gallate Färbung
FB	fan shaped body
GIGI	Glia Glia
GS	Glutaminsynthetase
HRP	Meerrettichperoxidase
IPN	intermediäre neuronale Vorläuferzellen
IS	intersegmentaler Nerv
LAL	lateraler azzessorischer Lobus
lal	laterale Antennenloben
Lb	Labrum
LNpG1	light neuropil glia
Lox	Lobulakomplex
MAL	Median azzessorische Loben
MB	Pilzkörper
MD	mediane Domäne
mocnr	medianer occelarer Wurzelnerv
NHS	Native Horse Serum
NpGI	Neuropilgliazelle

Oc	Ocellus
OL	optische Loben
p	posterior
P	Pionierneuron
PB	Protocerebrale Brücke
PBS	phosphatgepufferte Saline
pc	posteriore Kommissur
PC	Protocerebrum
PCC	protocerebrale Kommissur
PCII	posteriore Kommissur
PCP	primäre kommissurale Pionierneurone
PFA	paraformaldehyd
PI	Pars intercerebralis
repo	reversed polarity
S	segmentaler Nerv
S1	Mandibularkommissur
S2ac	anteriore Maxillarkommissur
S2pc	posteriore Mandibularkommissur
S3	Labialneuromer
SaGl	Satellite Glia
stom	Stomodeum
SuPnGl	Subperineuralgliazelle

T1	prothorakale Kommissur
TC	Tritocerebrum
TCC	tritocerebrale Kommissur
TpGl	Transportgliazelle
TrGl	Tracheal Gliazelle
v	ventral
vc	ventrale Kommissur
VNC	Bauchmark
w, x, y, z	Trakte des Zentralkomplexes
W, X, Y, Z	lineages der Trakte des Zentralkomplexes



## 8 Literaturverzeichnis

Alexopoulos H, Böttger A, Fischer S, Levin A, Wolf A, Fujisawa T, Hayakawa S, Gojobori T, Davies JA, David CN, Bacon JP (2004) Evolution of gap junctions: the missing link *Curr Biol* 14:879–880

Anstey ML, Rogers SM, Ott SR, Burrows M, Simpson SJ. (2009). Serotonin mediates behavioral gregarization underlying swarm formation in desert locusts. *Science*. 323(5914):627-630

Arendt, D., Nübler-Jung, K., 1996. Common ground plans in early development in mice and flies. *Bioessays* 18, 255-259

Awasaki T, Lai S-L, Ito K, Lee T (2008) Organization and postembryonic development of glial cells in the adult central brain of *Drosophila*. *J Neurosci* 28:13742–13753

Awasaki T, Lee T (2011) New tools for the analysis of glial cell biology in *Drosophila*. *Glia* 59:1377–1386

Bacon JP, Altman JS (1977) A silver intensification method for cobaltfilled neurones in wholemound preparations. *Brain Res* 138:359–363

Ball KK, Gandhi GK, Thrash J, Cruz NF, Dienel GA (2007) Astrocytic connexin distributions and rapid, extensive dye transfer via gap junctions in the inferior colliculus: implications for [14C] Glucose metabolite trafficking. *J Neurosci Res* 85:3267–3283

Banerjee S, Bhat MA (2007) Neuron-glial interactions in blood–brain barrier formation. *Ann Rev Neurosci* 30:235–258

Bastiani MJ, Goodman CS (1986) Guidance of neuronal growth cones in the grasshopper embryo. III. Recognition of specific glial pathways. *J Neurosci* 6:3542–3551

Bate, C.M. (1976). Pioneer neurons in an insect embryo. *Nature* 260, 54-56

- Bayraktar OA, Boone JQ, Drummond ML, Doe CQ (2010) *Drosophila* type II neuroblast lineages keep Prospero levels low to generate large clones that contribute to the adult brain central complex. *Neural Dev* 5:26
- Bear MF, Connors BW, Paradiso MA (2007) *Neuroscience. Exploring the brain*, 3rd edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
- Bello, B.C., Hirth, F., Gould, A.P., 2003. A pulse of the *Drosophila* hox protein Abdominal-A schedules the end of neural proliferation via neuroblast apoptosis. *Neuron* 37, 209-219
- Bello BC, Izergina N, Caussinus E, Reichert H (2008) Amplification of neural stem cell proliferation by intermediate progenitor cells in *Drosophila* brain development. *Neural Dev* 3:5
- Bender, J.A., Pollack, A.J., Ritzmann, R.E., (2010). Neural activity in the central complex of the insect brain is linked to locomotor changes. *Curr. Biol.* 20, 921-926
- Bentley D, Keshishian H, Shankland M, Torian-Raymond A (1979) Quantitative staging of embryonic development of the grasshopper, *Schistocerca nitens*. *J Embryol Exp Morphol* 54:47–74
- Böhm, A., Szucsich, N.U., Pass, G., 2012. Brain anatomy in Diplura (Hexapoda). *Front.Zool.* 9, 26
- Boone JQ, Doe CQ (2008) Identification of *Drosophila* type II neuroblast lineages containing transit amplifying ganglion mother cells. *Dev. Neurobiol.* 68(9):1185-95
- Booth GE, Kinrade EFV, Hidalgo A (2000) Glia maintain follower neuron survival during *Drosophila* CNS development. *Development* 127:237–244
- Bowman SK, Rolland V, Betschinger J, Kinsey KA, Emery G, Knoblich JA (2008) The tumor suppressors Brat and Numb regulate transit-amplifying neuroblast lineages in *Drosophila*. *Dev. Cell.* 14(4):535-46
- Boyan GS, Ball EE. (1993). The grasshopper, *Drosophila* and neuronal homology (advantages of the insect nervous system for the neuroscientist). *Progress in Neurobiology.* 41(6):657-682

Boyan G, Herbert Z, Williams L (2010a) Cell death shapes embryonic lineages of the central complex in the grasshopper *Schistocerca gregaria*. J Morphol 271:949–959

Boyan GS, Liu Y, Loser M (2012) A cellular network of dye-coupled glia associated with the embryonic central complex in the grasshopper *Schistocerca gregaria* Dev. Genes Evol. 222, 125 - 138

Boyan G, Loser M, Williams L, Liu Y (2011) Astrocyte-like glia associated with the embryonic development of the central complex in the grasshopper *Schistocerca gregaria*. Dev Genes Evol 221:141–155

Boyan, G.S., Reichert, H., Hirth, F. (2003) Commissure formation in the embryonic insect brain. Arthropod Struct Dev 32, 61-77.

Boyan GS, Reichert H (2011) Mechanisms for complexity in the brain: generating the insect central complex. Trends Neurosci 34:247–257

Boyan, G.S., Therianos, S., Williams, J.L., Reichert, H. (1995a) Axogenesis in the embryonic brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*: an identified cell analysis of early brain development. Development 121, 75-86

Boyan, G.S., Williams, J.L.D. (2008) Evidence that the primary brain commissure is pioneered by neurons with a peripheral-like ontogeny in the grasshopper *Schistocerca gregaria*. Arthropod Struct Dev 37, 186-198

Boyan, G.S., Williams, J.L.D., Reichert, H. (1995b) Organization of a midline proliferative cluster in the embryonic brain of the grasshopper. Roux's Arch Dev Biol 205, 45-53

Boyan, G.S., Williams, J.L., Reichert, H. (1995c) Morphogenetic reorganization of the brain during embryogenesis in the grasshopper. J Comp Neurol 361, 429-440

Boyan GS, Williams JLD (1997) Embryonic development of the pars intercerebralis/central complex of the grasshopper. Dev Genes Evol 207:317–329

Boyan G, Williams L, Götz S (2013) Postembryonic development of astrocyte-like glia of the central complex in the grasshopper *Schistocerca gregaria*. Cell Tissue Res. 351 (3): 361 - 72

- Boyan G, Williams L, Herbert Z (2010) Multipotent neuroblasts generate a biochemical neurarchitecture in the central complex of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *Cell Tissue Res* 340:13-28
- Boyan G, Williams L, Legl A, Herbert Z (2010b) Proliferative cell types in embryonic lineages of the central complex of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *Cell Tissue Res* 341:259–277
- Boyan G, Williams L, Meier T (1993) Organization of the commissural fibers in the adult brain of the locust. *J Comp Neurol* 332:358–377
- Boyan GS, Therianos S, Williams JLD, Reichert H (1995) Axogenesis in the embryonic brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*: an identified cell analysis of early brain development. *Development* 121:75–86
- Boyan GS, Williams JL, Herbert Z (2008a) Fascicle switching generates a chiasmal neuroarchitecture in the embryonic centralbody of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *Arthr Struct Dev* 37:539–544
- Boyan GS, Williams JL, Herbert Z (2008b) An ontogenetic analysis of locustatachykinin-like expression in the central complex of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *Arthr Struct Dev* 37:480–491
- Boyan GS, Williams JL, Liu Y (2015) Conserved patterns of axogenesis in the panarthropod brain. *Arthr Struct Dev* 44: 101-112
- Breidbach O, Dennis R, Marx J, Görlach C, Wiegandt H, Wegerhoff R (1992) Insect glial cells show differential expression of a glycolipid-derived, glucuronic acid-containing epitope throughout neurogenesis: detection during postembryogenesis and regeneration in the central nervous system of *Tenebrio molitor*. *L Neurosci Lett* 147:5–8
- Buchanan R, Benzer S (1993) Defective glia in the *Drosophila* brain degeneration mutant drop dead. *Neuron* 10:839–850
- Cantera R, Trujillo-Cenoz O (1996) Glial cells in insect ganglia. *Micr Res Tech* 35:285–293
- Bullock, T.H., Horridge, G.A., (1965). *Structure and Function in the Nervous Systems of Invertebrates*. Two volumes. Freeman, San Francisco

Burt JM, Spray DC (1980) Single-channel events and gating behavior of the cardiac gap junction channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:3431–3434

Carlson SD, Saint Marie RL (1990) Structure and function of insect glia. *Ann Rev Entomol* 35:597–621

Carlson SD, Juang JL, Hilgers SL, Garment MB (2000) Blood barriers of the insect. *Ann Rev Entomol* 45:151–174

Cayre, M., Strambi, C., Charpin, P., Augier, R., Meyer, M.R., Edwards, J.S., Strambi, A. (1996). Neurogenesis in adult insect mushroom bodies. *J Comp Neurol.* 371, 300-310.

Chapman, R.F. (2002). Development of phenotypic differences in sensillum populations on the antennae of a grasshopper, *Schistocerca Americana*. *Journal of Morphology* 254, 186-194.

Chapman JA, Kirkness EF, Simakov O, Hampson SE, Mitros T, Weinmaier T, Rattei T, Balasubramanian PG, Borman J, Busam D, Disbennett K, Pfannkoch C, Sumin N, Sutton GG, Viswanathan LD, Walenz B, Goodstein DM, Hellsten U, Kawashima T, Prochnik SE, Putnam NH, Shu S, Blumberg B, Dana CE, Gee L, Kibler DF, Law L, Lindgens D, Martinez DE, Peng J, Wigge PA, Bertulat B, Guder C, Nakamura Y, Ozbek S, Watanabe H, Khalturin K, Hemmrich G, Franke A, Augustin R, Fraune S, Hayakawa E, Hayakawa S, Hirose M, Hwang JS, Ikeo K, Nishimiya-Fujisawa C, Ogura A, Takahashi T, Steinmetz PRH, Zhang X, Aufschnaiter R, Eder M-E, Gorny A-K, Salvenmoser W, Heimberg AM, Wheeler BM, Peterson KJ, Böttger A, Tischler P, Wolf A, Gojobori T, Remington KA, Strausberg RL, Venter JC, Technau U, Hobmayer B, Bosch TCG, Holstein TW, Fujisawa T, Bode HR, David CN, Rokhsar DS, Steele RE (2010) The dynamic genome of *Hydra*. *Nature* 464:592–596

Condrón BG, Patel NH, Zinn K (1994) engrailed controls glial/ neuronal cell fate decisions at the midline of the central nervous system. *Neuron* 13:541–554

Copenhaver PF (1993) Origins, migration and differentiation of glial cells in the insect enteric nervous system from a discrete set of glial precursors. *Development* 117:59–74

- Crews ST, Thomas JB, Goodman CS (1988) The *Drosophila* singleminded gene encodes a nuclear protein with sequence similarity to the per gene product. *Cell* 52:143–151
- Doe CQ (2008) Neural stem cells: balancing self-renewal with differentiation. *Development* 135:1575–1587
- Doe CQ, Goodman CS (1985a) Early events in insect neurogenesis. I. Development and segmental differences in the pattern of neuronal precursor cells. *Dev Biol* 111:193–205
- Doe CQ, Goodman CS (1985b) Early events in insect neurogenesis. II. The role of cell interactions and cell lineage in the determination of neuronal precursor cells. *Dev Biol* 111:206–219
- Doe, C.Q., Technau, G.M., 1993. Identification and cell lineage of individual neural precursors in the *Drosophila* CNS. *Trends Neurosci.* 16, 510-514
- Doherty J, Logan MA, Tasdemir OE, Freeman MR (2009) Ensheathing glia function as phagocytes in the adult *Drosophila* brain. *J Neurosci* 29:4768–4781
- Dove, H., Stollewerk, A., 2003. Comparative analysis of neurogenesis in the myriapod *Glomeris marginata* (Diplopoda) suggests more similarities to chelicerates than to insects. *Development* 130, 2161-2171
- Ducret E, Alexopoulos H, Le Feuvre Y, Davies JA, Meyrand P, Bacon JP, Fénelon VS (2006) Innexins in the lobster stomatogastric nervous system: cloning, phylogenetic analysis, developmental changes and expression within adult identified dye and electrically coupled neurons. *Eur J Neurosci* 24:3119–3133
- Dykes IM, Freeman FM, Bacon JP, Davies JA (2004) Molecular basis of gap-junctional communication in the CNS of the leech *Hirudo medicinalis*. *J Neurosci* 24:886–94
- Ebens AJ, Garren H, Cheyette BN, Zipursky SL (1993) The *Drosophila* anachronism locus: a glycoprotein secreted by glia inhibits neuroblast proliferation. *Cell* 74:15–27

Edenfeld G, Volohonsky G, Krukkert K, Naffin E, Lammel U, Grimm A, Engelen D, Reuveny A, Volk T, Klämbt C (2006) The splicing factor Crooked Neck associates with the RNA-binding protein HOW to control glial cell maturation in *Drosophila*. *Neuron* 52:969–980

Edwards TN, Meinertzhagen IA (2010) The functional organisation of glia in the adult brain of *Drosophila* and other insects. *Prog Neurobiol* 90:471–497

el Jundi B, Heinze S, Lenschow C, Kurylas A, Rohlfing T, Homberg U (2010) The locust standard brain: a 3D standard of the central complex as a platform for neural network analysis. *Front Syst Neurosci* 3:21

Gocht D, Wagner S, Heinrich R (2009) Recognition, presence, and survival of locust central nervous glia in situ and in vitro. *Micr Res Tech* 72:385–397

Fielden A (1960) Transmission through the last abdominal ganglion of the dragonfly nymph *Anax imperator*. *J Exp Biol* 37:832–844

Fredieu JR, Mahowald AP (1989) Glial interactions with neurons during *Drosophila* embryogenesis. *Development* 106:739–748

Freeman MR, Doherty J (2006) Glial cell biology in *Drosophila* and vertebrates. *Trends Neurosci.* 29(2):82-90

Goodman CS, Doe CQ (1994) Embryonic development of the *Drosophila* central nervous system. In: Bate M, Martinez-Arias A (eds) *The development of Drosophila*, vol 1. Cold Spring Harbor Press, New York, pp 1131–1206

Goodman CS, O'Shea M, Caman R, Spitzer NC (1979) Embryonic development of identified neurons: temporal pattern of morphological and biochemical differentiation. *Science* 204:1219–1222

Goodman CS, Spitzer NC (1980) Embryonic development of neurotransmitter receptors in grasshoppers. In: Sattelle DB, Hall LM, Hildebrand JG (eds) *Receptors for neurotransmitters, hormones and pheromones in insects*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp 195–207

Goodman CS, Spitzer NC (1981) The development of electrical properties of identified neurons in grasshopper embryos. *J Physiol (Lond)* 313:385–413

- Granderath S, Bunse I, Klämbt C (2000) *gcm* and *pointed* synergistically control glial transcription of the *Drosophila* gene *loco*. Mech. Dev. 1;91(1-2):197-208
- Haase A, Stern M, Wächtler K, Bicker G (2001) A tissue-specific marker of Ecdysozoa. Dev Genes Evol 211:428–433
- Hähnelein I, Bicker G (1996) Morphology of neuroglia in the antennal lobes and mushroom bodies of the brain of the honeybee. J Comp Neurol 367:235–245
- Hähnelein I, Bicker G (1997) Glial patterning during postembryonic development of central neuropiles in the brain of the honeybee. Dev Genes Evol 207:29–41
- Halter DA, Urban J, Rickert C, Ner SS, Ito K, Travers AA, Technau GM (1995) The homeobox gene *repo* is required for the differentiation and maintenance of glial function in the embryonic nervous system of *Drosophila melanogaster*. Development 121:317–322
- Harley, C.M., Ritzmann, R.E., (2010). Electrolytic lesions within central complex neuropils of the cockroach brain affect negotiation of barriers. J. Exp. Biol. 231, 2851-2864
- Hartenstein V (2011) Morphological diversity and development of glia in *Drosophila*. Glia 59:1237–1252
- Hartenstein V, Nassif C, Lekven A (1998) Embryonic development of the *Drosophila* brain. II. Pattern of glia cells. J Comp Neurol 402:32–47
- Hartenstein V, Spindler S, Păreanu W, Fung S (2008) The development of the *Drosophila* larval brain. Adv Exp Med Biol 628:1–31
- Harzsch S, Hansson BS (2008) Brain architecture in the terrestrial hermit crab *Coenobita clypeatus* (Anomura, Coenobitidae), a crustacean with a good aerial sense of smell. BMC Neurosci 9:58
- Hatton GI (2002) Glial-neuronal interactions in the mammalian brain. Adv Physiol Educ 26:225–237
- Heinze, S., Gotthardt, S., Homberg, U., (2009). Transformation of polarized light information in the central complex of the locust. J. Neurosci. 29, 11783-11793



- Heinze S, Homberg U (2007) Maplike representation of celestial e-vector orientations in the brain of an insect. *Science* 315:995–997
- Heinze S, Homberg U (2008) Neuroarchitecture of the central complex of the desert locust: intrinsic and columnar neurons. *J Comp Neurol* 511:454–478
- Hidalgo A (2003) Neuron–glia interactions during axon guidance in *Drosophila*. *Biochem Soc Trans* 31:50–55
- Hidalgo A, Booth GE (2000) Glia dictate pioneer axon trajectories in the *Drosophila* embryonic CNS. *Development* 127:393–402
- Homberg, U., (1994). Flight-correlated activity changes in neurons of the lateral accessory lobes in the brain of the locust *Schistocerca gregaria*. *J. Comp. Physiol. A* 175, 597-610
- Homberg U (2002) Neurotransmitters and neuropeptides in the brain of the locust. *Microsc ResTech* 56:189–209
- Homberg, U., (2004). In search of the sky compass in the insect brain. *Naturwissenschaften* 91, 199-208
- Homberg, U., Heinze, S., Pfeiffer, K., Kinoshita, M., el Jundi, B., (2011). Central neural coding of sky polarization in insects. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 366, 680-687
- Hosoya T, Takizawa K, Nitta K, Hotta Y (1995) Glial cells missing: a binary switch between neuronal and glial determination in *Drosophila*. *Cell* 82:1025–1036
- Hoyle G (1986) Glial cells of an insect ganglion. *J Comp Neurol* 246:85–103
- Hossain MZ, Ernst LA, Nagy JI (1995) Utility of intensely fluorescent cyanine dyes (Cy3) for assay of gap junctional communication by dye-transfer. *Neurosci Lett* 184:71–74
- Houades V, Koulakoff A, Ezan P, Seif I, Giaume C (2008) Gap junction-mediated astrocytic networks in the mouse barrel cortex. *J Neurosci* 28:5207–5217

Huber, F., (1960). Untersuchungen über die Funktion des Zentralnervensystems und insbesondere des Gehirns bei der Fortbewegung und Lauterzeugung der Grillen. Z. Vgl. Physiol. 44, 60-132

Hummel, T., Schimmelpfeng, K., Klämbt, C., (1999a). Commissure formation in the embryonic CNS of *Drosophila*. I. Identification of the required gene functions. Dev. Biol. 209, 381-398.

Ilius M, Wolf R, Heisenberg M (1994) The central complex of *Drosophila melanogaster* is involved in flight control: studies on mutants and mosaics of the gene ellipsoid body open. J Neurogenet 9:189–206

Ito K, Awasaki T (2008) Clonal unit architecture of the adult fly brain. In: Technau GM (ed) Brain development in *Drosophila melanogaster*. Springer, New York, pp 137–158

Ito K, Urban J, Technau GM (1994) Distribution, classification and development of *Drosophila* glial cells during late embryogenesis. Roux's Arch Dev Biol 204:284–307

Ito K, Awano W, Suzuki K, Hiromi Y, Yamamoto D (1997) The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. Development 124:761–771

Izergina N, Balmer J, Bello B, Reichert H (2009) Postembryonic development of transit amplifying neuroblast lineages in the *Drosophila* brain. Neural Dev 4:44

Jacobs JR, Goodman CS (1989) Embryonic development of axon pathways in the *Drosophila* CNS. I. A glial scaffold appears before the first growth cones. J Neurosci 9:2402–2411

Jan LY, Jan YN (1982) Antibodies to horseradish-peroxidase as specific neuronal markers in *Drosophila* and grasshopper embryos. Proc Natl Acad Sci USA 79:2700–2704

Jones BW (2001) Glial cell development in the *Drosophila* embryo. BioEssays 23:877–887

Jones BW, Fetter RD, Tear G, Goodman CS (1995) Glial cells missing: a genetic switch that controls glial versus neuronal fate. Cell 82:1013–23

Juszczak GR, Swiergiel AH (2009) Properties of gap junction blockers and their behavioural, cognitive and electrophysiological effects: animal and human studies. *Prog Neuro-Psychopharm Biol Psychiat* 33:181–198

Klaes A, Menne T, Stollewerk A, Scholz H, Klämbt C (1994) The Ets transcription factors encoded by the *Drosophila* gene pointed direct glial cell differentiation in the embryonic CNS. *Cell* 78:149–160

Klämbt C (2009) Modes and regulation of glial migration in vertebrates and invertebrates. *Nat Rev Neurosci* 10:769–779

Klämbt C, Goodman CS (1991) The diversity and pattern of glia during axon pathwayformation in the *Drosophila* embryo. *Glia* 4:205–213

Klämbt C, Jacobs JR, Goodman CS (1991) The midline of the *Drosophila* central nervous system: a model for the genetic analysis of cell fate, cell migration, and growth cone guidance. *Cell* 64:801–815

Kollmann, M., Huetteroth, W., Schachtner, J., 2011. Brain organization in Collembola (springtails). *Arthropod Struct. Dev.* 40, 304-316

Koussa MA, Tolbert LP, Oland LA (2010) Development of a glial network in the olfactory nerve: role of calcium and neuronal activity. *Neuron Glia Biol* 6:245–261

Kretzschmar D, Pflugfelder GO (2002) Glia in development, function, and neurodegeneration of the adult insect brain. *Brain Res Bull* 57:121–31

Kriegstein, A., Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult stem cells. *Ann Rev Neurosci* 32, 149-184

Kurylas AE, Rohlfing T, Krofczik S, Jenett A, Homberg U. (2008). Standardized atlas of the brain of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Cell Tissue Res.* 333(1):125-145

Lanosa XA, Reisin HD, Santacrose I, Colombo JA (2008) Astroglial dye-coupling: an in vitro analysis of regional and interspecies differences in rodents and primates. *Brain Res* 1240:82–86

Lawrence, P.A., (1993). *The Making of a Fly*. Blackwell Science Ltd, Oxford

- Learte AR, Hidalgo A (2007) The role of glial cells in axon guidance, fasciculation and targeting. *Adv Exp Med Biol* 621:156–166
- Lee, T., Luo, L., 2001. Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) for *Drosophila* neural development. *Trends Neurosci.* 24, 251-254
- Leuzinger, S., Hirth, F., Gerlich, D., Acampora, D., Simeone, A., Gehring, W.J., Finkelstein, R., Furukubo-Tokunaga, K., Reichert, H., 1998. Equivalence of the fly orthodenticle gene and the human OTX genes in embryonic brain development of *Drosophila*. *Development* 125, 1703-1710
- Levine, R.B., (1984). Changes in neuronal circuits during insect metamorphosis. *J. Exp. Biol.* 112, 27-44
- Liddell, E., Weeks, I. (1996). *Antikörper-Techniken*. Spektrum Akademischer Verlag
- Liu Y (2013) Gliogenesis in the embryonic brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria* with particular focus on the protocerebrum prior to mid-embryogenesis. *Cell Tissue Res.* 354(3):697-705
- Liu Y, Boyan G (2013) Glia associated with central complex lineages in the embryonic brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *Dev Genes Evol* 223(4):213-23
- Liu G, Seiler H, Wen A, Zars T, Ito K, Wolf M, Heisenberg M, Liu L (2006) Distinct memory traces for two visual features in the *Drosophila* brain. *Nature* 439:551–556
- Loesel R, Weigel S, Braunig P (2006) A simple fluorescent double staining method for distinguishing neuronal from non-neuronal cells in the insect central nervous system. *J Neurosci Meth* 155:202–206
- Ludwig P, Williams JLD, Lodde E, Reichert H, Boyan GS (1999) Neurogenesis in the median domain of the embryonic brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *J Comp Neurol* 414:379–390
- Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD (1977) Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science* 195:1356–1358 Müller M, Homberg U, Kühn A (1997) Neuroarchitecture of the lower division of the central body in the brain of the locust (*Schistocerca gregaria*). *Cell Tissue Res* 288:159–176

- Mappes, M., Homberg, U., (2004). Behavioural analysis of polarisation vision in tethered flying locusts. *J. Comp. Physiol. A* 190, 61-68
- Mayer, G., Whittington, P.M., 2009. Velvet worm development links myriapods with chelicerates. *Proc. R. Soc. Lond. B* 276, 3571-3579
- Müller M, Homberg U, Kühn A (1997) Neuroarchitecture of the lower division of the central body in the brain of the locust (*Schistocerca gregaria*). *Cell Tissue. Res.* 288:159–176
- Naimski P, Bierzyimageski A, Fikus M (1980) Quantitative fluorescent analysis of different conformational forms of DNA bound to the dye 4',6-diamidine-2 phenylindole, and separated by gel electrophoresis. *Anal Biochem* 106:471–475
- Neuser K, Triphan T, Mronz M, Poeck B, Strauss R (2008) Analysis of a spatial orientation memory in *Drosophila*. *Nature* 453:1244–1247
- Newman EA (2001) Propagation of intercellular calcium waves in retinal astrocytes and Müller cells. *J Neurosci* 21:2215–2223
- Noordermeer JN, Kopczynski CC, Fetter RD, Bland KS, Chen W-Y, Goodman CS (1998) Wrapper, a novel member of the Ig superfamily, is expressed by midline glia and is required for them to ensheath commissural axons in *Drosophila*. *Neuron* 21:991–1001
- Nordlander RH, Edwards JS (1969) Postembryonic brain development in the monarch butterfly, *Danaus plexippus plexippus*, L. I Cellular events during brain morphogenesis. *Wilh Roux'Archiv* 162:197–217
- Oland LA, Tolbert LP (1987) Glial patterns during early development of antennal lobes of *Manduca sexta*: a comparison between normal lobes and lobes deprived of antennal axons. *J Comp Neurol* 255:196–207
- Oland LA, Tolbert LP (1989) Patterns of glial proliferation during formation of olfactory glomeruli in an insect. *Glia* 2:10–24
- Oland LA, Marrero HG, Burger I (1999) Glial cells in the developing and adult olfactory lobe of the moth *Manduca sexta*. *Cell Tissue Res* 297:527–545

- Pan, Y., Zhou, Y., Guo, C., Gong, H., Gong, Z., Liu, L., (2009). Differential roles of the fan-shaped body and the ellipsoid body in *Drosophila* visual pattern memory. *Learn. Mem.* 16, 289-295
- Page, D.T., (2002). Inductive patterning of the embryonic brain in *Drosophila*. *Development* 129, 2121-2128
- Page DT (2004) A mode of arthropod brain evolution suggested by *Drosophila* commissure development. *Evol Dev* 6:25–31
- Parker RJ, Auld VJ (2006) Roles of glia in the *Drosophila* nervous system. *Semin. Cell Dev. Biol.* 17(1):66-77
- Parys B, Cote A, Gallo V, De Koninck P, Sik A (2010) Intercellular calcium signaling between astrocytes and oligodendrocytes via gap junctions in culture. *Neuroscience* 167:1032–1043
- Pereanu W, Hartenstein V (2006) Neural lineages of the *Drosophila* brain: a three dimensional digital atlas of the pattern of lineage location and projection at the late larval stage. *J Neurosci* 26:5534–5553
- Pereanu W, Shy D, Hartenstein V (2005) Morphogenesis and proliferation of the larval brain glia in *Drosophila*. *Dev Biol* 283:191–203
- Pereanu W, Younossi-Hartenstein A, Lovick J, Spindler S, Hartenstein V (2010) A lineage-based analysis of the development of the central complex of the *Drosophila* brain. *J Comp Neurol.* doi:10.1002/cne.22542
- Phelan P, Goulding LA, Tam JLY, Dawber RJ, Davies JA, Bacon JP (2008) Molecular mechanism of rectification at an identified electrical synapse in the *Drosophila* giant fibre system. *Curr Biol* 18:1955–1960
- Pielage J, Klämbt C (2001) Glial cells aid axonal target selection. *Trends Neurosci* 24:432–433
- Poeck B, Fischer S, Gunning D, Zipursky SL, Salecker I (2001) Glial cells mediate target layer selection of retinal axons in the developing visual system of *Drosophila*. *Neuron* 29:99–113

- Prokop A, Technau G.M. (1994). Normal function of the mushroom body defect gene of *Drosophila* is required for the regulation of the number and proliferation of neuroblasts. *Dev. Biol.* 161(2), 321-337
- Rangarajan R, Gong Q, Gaul U (1999) Migration and function of glia in the developing *Drosophila* eye. *Development* 126:3285–3292
- Reichert H, (1993) Molecular correlates of neuronal specificity in the developing insect nervous system. *Mol. Neurobiol.* 7(3-4):349-62
- Reichert H, Boyan G (1997) Building a brain: developmental insights in insects. *Trends Neurosci* 20:258–263
- Rela L, Bordey A, Greer CA (2010) Olfactory ensheathing cell membrane properties are shaped by connectivity. *Glia* 58:665–678
- Renn SCN, Armstrong JD, Yang M, Wang Z, An X, Kaiser K, Taghert PH (1999) Genetic analysis of the *Drosophila* ellipsoid body neuropil: organization and development of the central complex. *J Neurobiol* 41:189–207
- Rogers SM, Matheson T, Sasaki K, Kendrick K, Simpson SJ, Burrows M. (2004). Substantial changes in central nervous system neurotransmitters and neuromodulators accompany phase change in the locust. *J Exp Biol.* 207(20):3603-3617
- Sakura, M., Lambrinos, D., Labhart, T., (2008). Polarized skylight navigation in Q2 insects: model and electrophysiology of e-vector coding by neurons in the central complex. *J. Neurophysiol.* 99, 667-682
- Salvaterra PM, Bournias-Vardiabasis N, Nair T, Hou G, Lieu C (1987) In vitro neuronal differentiation of *Drosophila* embryo cells. *J. Neurosci.* 7(1):10-22
- Sanes, D.H., Reh, T.A., Harris, W.A., (2012). *Development of the Nervous System*, third ed. Academic Press, Burlington Oxford
- Saitoh F, Toshiyuki A (2010) Proteasomal degradation of glutamine synthetase regulates Schwann cell differentiation. *J Neurosci* 30:1204–1212

- Schmidt J, Deitmar JW (1996) Photoinactivation of the giant neuropil glial cells in the leech *Hirudo medicinalis*: effects on neuronal activity and synaptic transmission. *J Neurophysiol* 76:2861–2871
- Schofield PK, Swales LS, Trehern JE (1984) Potentials associated with the blood–brain barrier of an insect: recordings from identified neuroglia. *J Exp Biol* 109:307–318
- Scholz H, Sadlowski E, Klaes A, Klämbt C (1997) Control of midline glia development in the embryonic *Drosophila* CNS. *Mech Dev* 62:79–91
- Schummers J, Yu H, Sur M (2008) Tuned responses of astrocytes and their influence on hemodynamic signals in the visual cortex. *Science* 320:1638–1643
- Seaver EC, Carpenter EM, Bastiani MJ (1996) REGA-1 is a GPIlinked member of the immunoglobulin superfamily present on restricted regions of sheath cell processes in grasshopper. *Development* 122:567–578
- Sedaghat, Y., Sonnenfeld, M., (2002). The jing gene is required for embryonic brain development in *Drosophila*. *Dev. Genes Evol.* 212, 277-287
- Seeger M, Tear G, Ferres-Marco D, Goodman CS (1993) Mutations affecting growth cone guidance in *Drosophila*: genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron* 10:409–426
- Seidel, C, Bicker, G. (2002). Developmental expression of nitric oxide/cyclic GMPsignaling pathways in the brain of the embryonic grasshopper. *Brain Res.Dev. Brain Res.* 138(1), 71-79
- Sepp KJ, Auld VJ (2003) Reciprocal interactions between neurons and glia are required for *Drosophila* peripheral nervous system development. *J Neurosci* 23:8221–8230
- Sepp KJ, Schulte J, Auld VJ (2001) Peripheral glia direct axon guidance across the CNS/PNS transition zone. *Dev Biol* 238:47–63
- Silies S, Klämbt C (2011) Adhesion and signaling between neurons and glia cells in *Drosophila*. *Curr Opin Neurobiol* 21:11–16



- Silies M, Yuva Y, Engelen D, Aho A, Stork T, Klämbt C (2007) Glial cell migration in the eye disc. *J Neurosci* 27:13130–13139
- Sintoni, S., Benton, J.L., Beltz, B.S., Hansson, B.S., Harzsch, S., 2012. Neurogenesis in the central olfactory pathway of adult decapod crustaceans: development of the neurogenic niche in the brains of procambarid crayfish. *Neural Dev.* 7, 1
- Snow PM, Patel NH, Harrelson AL, Goodman CS (1987) Neural-specific carbohydrate moiety shared by many surface glycoproteins in *Drosophila* and grasshopper embryos. *J Neurosci* 7:4137–4144
- Sonnenfeld MJ, Jacobs JR (1995) Apoptosis of the midline glia during *Drosophila* embryogenesis: a correlation with axon contact. *Development* 121:569–578
- Stevenson PA, Kutsch W (1986) Basic circuitry of an adult-specific motor program completed with embryogenesis. *Naturwissenschaften* 73:741–743
- Stollewerk, A., 2002. Recruitment of cell groups through Delta/Notch signalling during spider neurogenesis. *Development* 129, 5339-5348.
- Stollewerk, A., Weller, M., Tautz, D., 2001. Neurogenesis in the spider *Cupiennius salei*. *Development* 128, 2673-2688
- Strausfeld, N.J., (1999). A brain region in insects that supervises walking. *Prog. Brain Res.* 123, 273-284
- Strausfeld NJ (2009) Brain organization and the origin of insects: an assessment. *Proc R Soc B* 276:1929–1937
- Strausfeld, N.J., (2012). *Arthropod Brains*. Harvard Univ. Press, Cambridge
- Strauss, R. (1996) The Central Complex is a Higher Centre for Locomotor Control in Insects. Evidence from new *Drosophila melanogaster* Mutants. *Proceedings XX International Congress of Entomology, Florence*, p.198.
- Strauss R (2002) The central complex and the genetic dissection of locomotor behaviour. *Curr Opin Neurobiol* 12:633–638

- Strauss R, Heisenberg M (1993) A higher control center of locomotor behavior in the *Drosophila* brain. J Neurosci 13:1852–1861
- Strauss R, Hanesch U, Kinkelin M, Wolf R, Heisenberg M (1992) Nobridge of *Drosophila melanogaster*: portrait of a structural brain mutant of the central complex. J Neurogenet 8:125–155
- Sun B, Salvaterra PM (1995) Characterization of nervana, a *Drosophila melanogaster* neuron-specific glycoprotein antigen recognized by anti-horseradish peroxidase antibodies. J. Neurochem. 65(1):434–43
- Sun B, Salvaterra PM (1995) Two *Drosophila* nervous system antigens, Nervana 1 and 2, are homologous to the beta subunit of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92(12):5396–400
- Swales LS, Lane NJ (1985) Embryonic development of glial cells and their junctions in the locust central nervous system. J Neurosci 5:117–127
- Taghert, P.H., Doe, C.Q., Goodman, C.S., 1984. Cell determination and regulation during development of neuroblasts and neurones in grasshopper embryo. Nature 307, 163–165.
- Takahashi DK, Vargas JR, Wilcox KS (2010) Increased coupling and altered glutamate transport currents in astrocytes following kainic acid-induced status epilepticus. Neurobiol Dis 40:573–585
- Tanaka M, Yamaguchi K, Tatsukawa T, Theis M, Willecke K, Itohara S (2008) Connexin43 and Bergmann glial gap junctions in cerebellar function. Front Neurosci 2:225–233
- Theiss C, Meller K (2002) Aluminum impairs gap junctional intercellular communication between astroglial cells in vitro. Cell Tissue Res 310:143–154
- Therianos S, Leuzinger S, Hirth F, Goodman CS, Reichert H (1995) Embryonic development of the *Drosophila* brain: formation of commissural and descending pathways. Development 121:3849–3860
- Thomas, J.B., Bastiani, M.J., Bate, M., Goodman, C.S. (1984) From grasshopper to *Drosophila*: a common plan for neuronal development. Nature 310, 203–207

- Thomas JB, Crews ST, Goodman CS (1988) Molecular genetics of the *single-minded* locus: a gene involved in the development of the *Drosophila* nervous system. *Cell* 52:133–141
- Tiemeyer M, Goodman CS (1996) Glioblastin is a novel carbohydrate binding protein expressed by a subset of glia in the embryonic *Drosophila* nervous system. *Development* 122:925–936
- Tix, S., Eule, E., Fischbach, K.-F., Benzer, S., (1997). Glia in the chiasms and medulla of the *Drosophila melanogaster* optic lobes. *Cell Tissue Res.* 289, 397-409
- Tomer, R., Denes, A.S., Tessmar-Raible, K., Arendt, D., 2010. Profiling by image registration reveals common origin of Annelid mushroom bodies and vertebrate pallium. *Cell* 142, 800-809
- Triphan, T., Poeck, B., Neuser, K., Strauss, R., (2010). Visual targeting of motor actions in climbing *Drosophila*. *Curr. Biol.* 20, 663-668
- Urbach, R., Schnabel, R., Technau, G.M., 2003a. The pattern of neuroblast formation, mitotic domains, and proneural gene expression during early brain development in *Drosophila*. *Development* 130, 3589-3606
- Urbach, R., Technau, G.M., Breidbach, O., 2003b. Spatial and temporal pattern of neuroblasts, proliferation, and engrailed expression during early brain development in *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera). *Arthropod Struct. Dev.* 32, 125-140
- Urbach, R., Technau, G.M. (2003). Early steps in building the insect brain: neuroblast formation and segmental patterning in the developing brain of different insect species. *Arthropod. Struct. Dev.* 32(1), 103-123
- Urbach, R., Technau, G.M., 2004. Neuroblast formation and patterning during early brain development in *Drosophila*. *Bioessays* 26, 739-751
- van der Hel WS, Notenboom RGE, Bos IWM, van Rijen PC, van Veelen CWM, de Graan PNE (2005) Reduced glutamine synthetase in hippocampal areas with neuron loss in temporal lobe epilepsy. *Neurology* 64:326–333
- Vanhems E (1985) An in vitro autoradiographic study of gliogenesis in the embryonic locust brain. *Dev Brain Res* 23:269–275

- Vanhems E, Delbos M (1987) Differentiation of glial cells and neurite outgrowth obtained from embryonic locust central nervous system explants. *Brain Res* 411:129–138
- Vanhems E, Girardie J (1983) Undifferentiated cells present in the pars intercerebralis of larval and adult locusts are glial precursors. Autoradiographic and ultrastructural study in vivo and in vitro. *Dev Brain Res* 10:177–185
- Vasenkova I, Luginbuhl D, Chiba A (2006) Gliopodia extend the range of direct glia-neuron communication during the CNS development in *Drosophila*. *Mol Cell Neurosci* 31:123–130
- Viktorin G, Riebli N, Popkova A, Giangrande A, Reichert H (2011) Multipotent neural stem cells generate glial cells of the central complex through transit amplifying intermediate progenitors in *Drosophila* brain development. *Dev Biol* 356:553–565
- Vitzthum H, Homberg U, Agricola H (1996) Distribution of Dip-Allostatin I-like immunoreactivity in the brain of the locust *Schistocerca gregaria* with detailed analysis of immunostaining in the central complex. *J. Comp. Neurol.* 369:419–437
- Vitzthum, H., Müller, M., Homberg, U., (2002). Neurons of the central complex of the locust *Schistocerca gregaria* are sensitive to polarized light. *J. Neurosci.* 22, 1114-1125
- Ward M, Jobling A, Puthussery T, Foster L, Fletcher E (2004) Localization and expression of the glutamate transporter, excitatory amino acid transporter 4, within astrocytes of the rat retina. *Cell Tissue Res* 315:305–310
- Weber PA, Chang HC, Spaeth KE, Nitsche JM, Nicholson BJ (2004) The permeability of gap junction channels to probes of different size is dependent on connexin composition and permeant-pore affinities. *Biophys J* 87:958–973
- Wedler FC, Horn BR (1976) Catalytic mechanisms of glutamine synthetase enzymes. *J Biol Chem* 251:7530–7538
- Wegerhoff, R., Breidbach, O., (1992). Structure and development of the larval central complex in a holometabolous insect, the beetle *Tenebrio molitor*. *Cell Tissue Res.* 268, 341-358

- Wegerhoff, R., Breidbach, O., Lobemeier, M., (1996). Development of locustatachykinin immunopositive neurons in the central complex of the beetle *Tenebriomolitor*. J. Comp. Neurol. 375, 157-166
- Weir, P.T., Dickinson, M.H., (2012). Flying *Drosophila* orient to sky polarization. Curr. Biol. 22, 21-27
- Weingart R, Bukauskas FF (1998) Long-chain n-alkanols and arachidonic acid interfere with the Vm-sensitive gating mechanisms of gap junction channels. Eur J Physiol 435:310–319
- Weinrich, A., Kunst, M., Wirmer, A., Holstein, G.R., Heinrich, R., (2008). Suppression of grasshopper sound production by nitric oxide-releasing neurons of the central complex. J. Comp. Physiol. A 194, 763-776
- Wheeler, W.M. (1891) Neuroblasts in the arthropod embryo. Journal of Morphology 4, 337-342
- Whittington, P.M., 1995. Conservation versus change in early axogenesis in arthropod embryos: a comparison between myriapods, crustaceans and insects. In: Breidbach, O., Kutsch, W. (Eds.), The Nervous Systems of Invertebrates: an Evolutionary and Comparative Approach. Birkhäuser, Basel, pp. 181-219
- Wilcox MJ (1994) Structure and function of gap junctions in the photoreceptor axon terminals of the fly. Adv Chem 235:225–243
- Williams JLD (1972) Some observations on the neuronal organization of the supraoesophageal ganglion in *Schistocerca gregaria*, Forskål, with particular reference to the central complex. Ph.D. Thesis, University of Wales, Cardiff
- Williams JLD (1975) Anatomical studies of the insect central nervous system: a ground-plan of the midbrain and an introduction to the central complex in the locust, *Schistocerca gregaria* (Orthoptera). J Zool Lond 176:67–86
- Williams JLD, Guentner M, Boyan GS (2005) Building the central complex of the grasshopper *Schistocerca gregaria*: temporal topology organizes the neuroarchitecture of the w, x, y, z tracts. Arthr Struct Dev 34:97–110

Wilson WD, Tanious FA, Barton HJ, Jones RL, Fox K, Wydra RL, Strekowski L (1990) DNA sequence dependent binding modes of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). *Biochemistry* 29(36):8452-61

Xiong W, Okano H, Patel N, Blendy J, Montell C (1994) Repo encodes a glial-specific homeo domain protein required in the *Drosophila* nervous system. *Genes Dev* 8:981–994

Young JM, Armstrong JD (2010a) Structure of the adult central complex in *Drosophila*: organization of distinct neuronal subsets. *J Comp Neurol* 518:1500–1524

Young JM, Armstrong JD (2010b) Building the central complex in *Drosophila*: the generation and development of distinct subsets. *J Comp Neurol* 518:1525–1541

Zacharias D, Williams JLD, Meier T, Reichert H (1993) Neurogenesis in the insect brain: Cellular identification and molecular characterization of brain neuroblasts in the grasshopper embryo. *Development* 118:941–955

Zahs KR, Newman E (1997) Asymmetric gap junctional coupling between glial cells in the rat retina. *Glia* 20:10–22

Zak NB, Wides RJ, Schejter ED, Raz E, Shilo BZ (1990) Localization of the DER/flb protein in embryos: implications on the faint little ball lethal phenotype. *Development* 109:865–839

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. George Boyan danke ich ganz besonders für die Bereitstellung des Themas meiner Dissertation, und für die ausgesprochen guten Betreuung meiner Arbeit. Ich habe mich in Ihrer Arbeitsgruppe stets sehr wohl gefühlt.

Ganz herzlich danke ich Herrn Dr. Mario Wullimann, der sich bereit erklärt hat die Arbeit zu begutachten.

Ebenfalls ganz besonders danke ich Karin Fischer, die mir jeder Zeit mit Rat und Tat im Labor zur Seite stand. Ebenso danke ich Dr. Yu Liu für die gute kollegiale Zusammenarbeit.

Ein weiteres Dankeschön geht an die Kollegen mit denen ich das Büro teilen durfte. Danke, für die schöne Zeit in der ihr mich, und ich euch ausgehalten habe.

Dem gesamten Lehrstuhl danke ich für die tolle kollegiale und konstruktive Arbeitsatmosphäre.

Ebenso gebührt mein Dank der Deutschen Forschungsgemeinschaft, über die das Projekt meiner Doktorarbeit (BO 1434/3-5) finanziert wurde. Und natürlich der Graduate School of Systemic Neuroscience, die mir für die letzten 6 Monate der Doktorarbeit ein Stipendium ermöglicht hat.

Ein ganz besonderer Dank gebührt meinen Eltern für die außerordentliche Unterstützung und Kraft, ohne die das Studium gar nicht möglich gewesen wäre.

Und zu guter Letzt meiner Freundin Asja, für die Hilfe bei der Formatierung der Doktorarbeit. Und ganz besonders für die geduldige und mentale Unterstützung.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

**Name:** Michael Loser

**Geburtsdatum:** 08.02.1977

**Geburtsort:** Mosbach

**Nationalität:** deutsch

### Schulbildung:

**1995-1998** Eckenberg Gymnasium Adelsheim

**1994-1995** Kaufmännisches Berufskolleg I Mosbach

**1987-1994** Realschule Obrigheim

**1983-1987** Grundschule Diedesheim

### Universitäre Ausbildung:

**seit 10.2009** Doktorarbeit AG Boyan (Neurobiologie) LMU

**2001-2007** Studium der Biologie an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz  
Hauptfächer: Neurobiologie, Genetik, Mikrobiologie  
Diplomthema: Der retinale ON-Kanal: der relative Beitrag des  
L-Zapfens zur Ganzfeldbewegungswahrnehmung unter mesopischen  
Beleuchtungsbedingungen beim Goldfisch.

**2000-2001** Magisterstudiengang Soziologie, Germanistik und Philosophie an der  
Universität Köln Der Kanzler



## Publikationen

**Boyan G, Loser M, Williams L, Liu Y (2011) Dev Genes Evol 221:141-155**

Astrocyte-like glia associated with the embryonic development of the central complex in the grasshopper *Schistocerca gregaria*.

**Boyan GS, Liu Y, Loser M (2012) Dev Genes Evol. 222:125-138**

A cellular network of dye-coupled glia associated with the embryonic central complex in the grasshopper *Schistocerca gregaria*.

### Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den 05.11.2015 .....Michael Loser.....

(Unterschrift)

### Erklärung

Hiermit erkläre ich, \*

☒

dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist.

☒

dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg **nicht** unterzogen habe.

☐

dass ich mich mit Erfolg der Doktorprüfung im Hauptfach .....  
und in den Nebenfächern .....

bei der Fakultät für ..... der .....

(Hochschule/Universität)

unterzogen habe.

☐

dass ich ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

München, den 05.11.2015.....Michael Loser.....

(Unterschrift)

\*) Nichtzutreffendes streichen